UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE NICOTINSÄURE-BILDUNG UND NICOTINSÄUREAMID-DESAMIDASE IN ENDOMYCOPSIS VERNALIS UND TORULOPSIS UTILIS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
Günter Drephal
aus Groß-Methling (Meckl.)

Marburg/Lahn 1969

E. Symon · Foto-Druck · 355 Marburg/L. · Friedrichstr. 3

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534905_0022

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE NICOTINSÄURE-BILDUNG UND NICOTINSÄUREAMID-DESAMIDASE IN ENDOMYCOPSIS VERNALIS UND TORULOPSIS UTILIS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

Vorgelegt von
Günter Drephal
aus Groß-Methling (Meckl.)

Marburg/Lahn 1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 11.5.1969
Tag der mündlichen Prüfung am 14.5.1969
Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kating
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Nultsch

Gedruckt mit Unterstützung des Marburger
Universitätsbundes

Herrn Professor Dr. H. Kating danke ich herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine stete Hilfsbereitschaft und Förderung, die er mir hat zuteil werden lassen.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

A. Einleitung und Problemstellung 5

B. Material und Methode 1o

I. Versuchsorganismen und Kulturbedingungen 1o

1. Stammkulturen 1o

2. Nährlösungen und Sterilisation 1o

3. Kulturansätze 11

4. Ernte des Untersuchungsmaterials 13

II. Analysenmethoden 14

1. Chromatographischer Nachweis der Nicotinsäure und ihres Amids 14

2. Quantitative Bestimmung der Gesamt-Nicotinsäure 15

3. Säulenchromatographische Anreicherung 16

4. Analysen mit ^{14}C-markierter Asparaginsäure 17

a) Nachweis von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid im aethanolischen Extrakt der Pilze 17

b) Nachweis der Gesamt-Nicotinsäure im alkoholextrahierten Zellmaterial 18

c) Nachweis der Gesamt-Nicotinsäure im Kulturfiltrat 18

5. Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs im Pilzmaterial 18

6. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase 19

a) Herstellung der Acetontrockenpulverextrakte 19

b) Nachweis der Desamidase-Aktivität 2o

c) Eiweißbestimmung des Acetonpulver-Extraktes 21

C. Ergebnisse 23

I. Voruntersuchungen zur quantitativen Nicotinsäurebestimmung 23

II. Der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt von *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* in Abhängigkeit von der Kulturdauer und der N-Quelle 34

Seite

1. Gesamt-Nicotinsäure im Mycel der Aufwuchskulturen von Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis 35

a) Endomycopsis vernalis 35

b) Torulopsis utilis 36

2. Der Einfluß der N-Konzentration in der Nährlösung auf die Nicotinsäure-Bildung in Oberflächenkulturen von Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis 38

3. Auftreten von Nicotinsäure-Derivaten in den Restnährlösungen von Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis 42

III. Die Nicotinsäure-Bildung bei Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis in Abhängigkeit von der N-Quelle 46

1. Wachstum, N-Assimilation und Nicotinsäure-Bildung der Umpflanzkulturen von Endomycopsis vernalis auf Glutamin, Ornithin, Lysin und Tryptophan 46

2. Wachstum, N-Assimilation und Nicotinsäure-Bildung der Umpflanzkulturen von Torulopsis utilis auf Ornithin, Lysin, Tryptophan, Asparaginsäure und Ammoniumphosphat 53

IV. Untersuchungen zur Biosynthese der Nicotinsäure in Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis 61

1. Vorversuche 61

2. Nicotinsäure-Synthese über den Tryptophan-Abbauweg in ruhenden Kulturen von Endomycopsis vernalis 63

a) DL-Kynurenin 63
b) 3-Hydroxy-anthranilsäure 64
c) Chinolinsäure 64

3. Nicotinsäure-Synthese über den Tryptophan-Abbauweg in ruhenden Kulturen von Torulopsis utilis 65

a) DL-Kynurenin 65
b) 3-Hydroxy-anthranilsäure 66
c) Chinolinsäure 67

4. Der Nicotinsäure-Gehalt anaerob gezogener Umpflanzkulturen von Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis auf Asparaginsäure und Glycerin 69

5. Untersuchungen zur Nicotinsäure-Synthese bei Endomycopsis vernalis mit $^{14}C(U)$-L-Asparaginsäure 72

Seite

V. Eigenschaften der Nicotinsäureamid-desamidasen von Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis 74

1. Die Nicotinsäureamid-desamidase von Endomycopsis vernalis 75

a) Nachweis einer Desamidase-Aktivität im Acetonpulver 75

b) Die spezifische Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase 76

c) Einfluß der Temperatur auf die Stabilität 79

d) Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Kulturdauer 81

e) Einfluß chemischer Agentien auf die Desamidase-Aktivität 82

2. Die Nicotinsäureamid-desamidase von Torulopsis utilis 85

a) Nachweis und spezifische Aktivität der Desamidase im Acetonpulver-Extrakt 85

b) Einfluß der Temperatur auf die Desamidase-Aktivität 88

c) Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Kulturdauer 9o

d) Der Einfluß chemischer Agentien auf die Desamidase-Aktivität 91

3. Diskussion über die Nicotinsäureamid-desamidasen von Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis 95

VI. Zur physiologischen Wirkung von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid bei Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis 98

1. Der Einfluß von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid auf das Wachstum von Endomycopsis und Torulopsis 98

2. Untersuchungen zur Verwertung von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid durch Endomycopsis und Torulopsis 1o1

3. Trockensubstanzproduktion, Gesamt-N und Ätherlösliches in Umpflanzkulturen auf Nicotinsäureamid 1o2

D. Diskussion 1o6

E. Zusammenfassung 117

Seite

F. Arbeitsvorschriften 12o

1. Nicotinsäurebestimmung 12o
2. Bestimmung des Gesamt-Stickstoff-Gehaltes 122
3. Ammoniak-Bestimmung nach E.J. CONWAY (1962) 123
4. Eichkurve zur Eiweißbestimmung 124
5. Nachweis auf Sauerstoff-Freiheit eines Gasgemisches 125

G. Literaturverzeichnis 126

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Nicotinsäure beziehungsweise ihr Amid ist als Baustein der Pyridinnucleotide [vor allem des Nicotinamid-adenin-dinucleotids (NAD) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphats (NADP)] in allen lebenden Zellen vorhanden. Ihre Rolle als Bestandteil dieser Coenzyme wurde erstmals von O. WARBURG u. W. CHRISTIAN (1934; 1935) und von H. EULER u. Mitarb. (1936) erkannt ("Coenzyme I" und "II"). Heute wissen wir, daß die Pyridinderivate in den Coenzymen NAD und NADP die aktiven Zentren von mehr als 5o wasserstoffübertragenden Fermenten sind (siehe u.a. A. KORNBERG u. W.E. PRICER, 195o; M.E. PULLMAN u. Mitarb. 1954; die zusammenfassenden Darstellungen von H. KNOBLOCH, 1957 und S. CHAYKIN, 1967). - In den Jahren 1937-38 identifizierten D.T. SMITH u. Mitarb. (1937) sowie T.D. SPIES u. Mitarb. (1938) überdies Nicotinsäure und Nicotinsäureamid als den "PP-Faktor" (pellagra preventing factor = Vitamin-PP), dessen Zufuhr das seit geraumer Zeit als Mangelkrankheit erkannte Pellagra zu heilen vermag. Sowohl wegen der bedeutenden stoffwechselphysiologischen Rolle als auch wegen der Vitaminnatur sind Nicotinsäure-Nicotinsäureamid seit den dreißiger Jahren dieses Jahrhunderts Gegenstand zahlreicher physiologischer, biochemischer und pharmakologischer Untersuchungen. Eine Zusammenfassung hierüber hat unlängst H. KATING (1968) gegeben.

Unter den Vitaminen nimmt die Nicotinsäure insofern eine Sonderstellung ein, als sie von Säugetieren synthetisiert werden kann. Die höheren Pflanzen sind generell zur Biosynthese der Nicotinsäure befähigt, während für zahlreiche Mikroorganismen,

vor allem Bakterienstämme, diese Substanz ein essentieller Wuchsstoff ist (K. HASSE, (1958); die meisten Pilze sind nicotinsäure-autotroph (E.O. MORRIS,1958).

Die Biosynthese der Nicotinsäure und des Amids ist nach der heutigen Kenntnis auf zwei Wegen möglich. Beide Synthesewege führen jedoch zum im NAD beziehungsweise NADP gebundenen Nicotinsäureamid. Der erste Weg geht vom Tryptophan aus, dessen Umwandlung zum gebundenen Nicotinsäureamid mit den wichtigsten Zwischenprodukten in Abb. 1 (Reaktionsschritte 1 bis 1o) wiedergegeben wurde. Dieser sogenannte Tryptophan-Abbauweg ist durch umfangreiche Untersuchungen an Säugetieren, N e u r o s p o r a c r a s s a - Mutanten sowie mit isolierten Enzymsystemen bewiesen worden; Tryptophan wird oxydativ (1) zu N-Formylkynurenin gespalten, das enzymatisch weiter über Kynurenin, Hydroxykynurenin zu Hydroxyanthranilsäure umgewandelt wird (2, 3 und 4). Die oxydative Spaltung des Benzolringes (5) der Hydroxyanthranilsäure führt zur 2-Acroleyl-3-aminofumarsäure, die sehr unbeständig ist und spontan in einer nichtenzymatischen Reaktion (6) zu Chinolinsäure kondensiert. In Gegenwart von 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat wird die Chinolinsäure in das Chinolinsäure-ribonucleotid übergeführt, das sofort - wahrscheinlich in einem Reaktionsschritt (7 und 8) - zu Nicotinsäure-ribonucleotid decarboxyliert wird. In Gegenwart von Adenosintriphosphat entsteht aus dem Ribonucleotid das Nicotinsäure-adenin-dinucleotid (9) und nach Amidierung mittels Glutamin (1o) oder Ammonium-Ionen das NAD. - Erst durch den NAD-Abbau tritt freies Nicotinsäureamid auf, das dann durch die Nicotinsäureamid-desamidase (11) zur freien Nicotinsäure hydrolysiert wird (Y.S. HALPERN u. N. GROSSOWICZ,

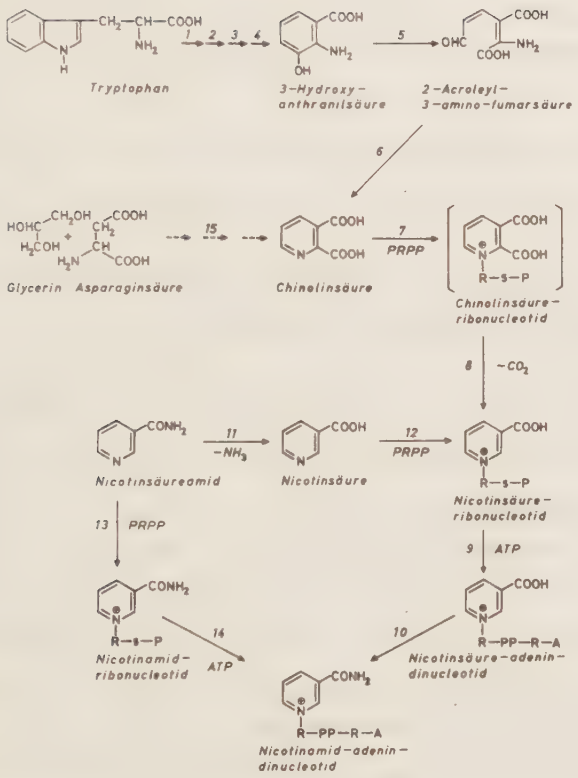


Abbildung 1: Die Stoffwechselwege der Biosynthese von Nicotinamid-adenin-dinucleotid. 1 = Tryptophan-oxygenase (Y. KOTAKE u. T. MASAYAMA, 1936); 2 = Kynurenin-formamidase (W.E. KNOX u. A.H. MEHLER, 1950); 3 = Kynurenin-3-hydroxylase (C. YANOFSKY u. D.M. BONNER, 1951); 4 = Kynureninase (C.E. DALGLIESH u. Mitarb., 1951); 5 = 3-Hydroxyanthranilsäure-oxygenase (C.O. STEVENS u. L.M. HENDERSON, 1959); 6 = Spontanreaktion; 7 und 8 = Chinolinsäure-transphosphoribosylase (Y. NISHIZUKA u. O. HAYAISHI, 1963); 9 = Nicotinsäuremononucleotid-adenylyltransferase (A. KORNBERG, 1950); 10 = NAD-synthetase (J. PREISS u. P. HANDLER, 1957; J. PREISS, 1958); 11 = Nicotinsäureamid-desamidase (D.E. HUGHES u. D.H. WILLIAMSON, 1953); 12 = Nicotinsäure-ribonucleotid-pyrophosphorylase (J. PREISS u. P. HANDLER, 1958); 13 = Nicotinamid-ribonucleotid-pyrophosphorylase (L.S. DIETRICH u. Mitarb., 1966); 14 = NMN-adenylyltransferase (A. MALKIN u. O.F. DENSTEDT, 1956); A = Adenin; P = Phosphat; R = Ribose.

1957). Beide können dann wieder (siehe Reaktionsschritte 12, 9 und 1o bzw. 13 und 14) direkt zur NAD-Synthese herangezogen werden (J. PREISS u. P. HANDLER, 1958; L.S. DIETRICH u. Mitarb., 1966).

Der zweite Biosyntheseweg, der wahrscheinlich vor allem von Bakterien und höheren Pflanzen beschritten wird (siehe u.a. E. LEETE u. A.R. FRIEMAN, 1964; K.S. YANG u. G.R. WALLER, 1965; S.R. JOHNS u. L. MARION, 1966), geht von C_3- und C_4-Verbindungen aus (M.V. ORTEGA u. G.M. BROWN, 1960). M y c o b a c t e r i u m - Arten (E. MOTHES u. Mitarb., 1961) und andere Mikroorganismen (siehe u.a. T.A. SCOTT u. H. HUSSEY, 1965; A.J. ISQUITH u. A.G. MOAT, 1966) synthetisieren Nicotinsäure auf diese Weise aus Glycerin und Asparaginsäure (siehe Reaktion 15, Abb. 1). Über den Reaktionsmechanismus dieser Synthese weiß man zur Zeit nur, daß als Kondensationsprodukt die Chinolinsäure entsteht, die entsprechend dem Schema (Abb. 1; Reaktion 7/8) in Nicotinsäureribonucleotid übergeführt wird (K. KONNO u. Mitarb., 1965; D. GROSS u. Mitarb., 1968), das dann wahrscheinlich auf dem bekannten Weg (9 und 1o, Abb. 1) weiter zu NAD metabolisiert wird.

Beide Biosynthesewege können nach neueren Untersuchungen von F. AHMAD u. A.G. MOAT (1966) an S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e auch nebeneinander in der Zelle vorkommen: Unter aeroben Kulturbedingungen wird vornehmlich der Tryptophan-Abbauweg zur Nicotinsäure ynthese beschritten, während die Biosynthese bei anaerob gezogenen Kulturen hauptsächlich von der Asparaginsäure ausgeht (H.D. HEILMANN u. F. LINGENS, 1968).

Während zahlreiche Arbeiten über die Biosynthese der Nicotinsäure und ihren Gehalt in Mikroorganismen als Vitaminspender

beschrieben worden sind, liegen nur wenige Untersuchungen über die Abhängigkeit ihrer Bildung von den Kulturbedingungen und ihren Metabolismus im Verlaufe der Kulturdauer vor. Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen war der Befund von H. KATING (1959), daß die beiden auxoautotrophen Pilze *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* auf Nicotinsäureamid als alleiniger N-Quelle nicht zu wachsen vermögen. Andererseits vermögen aber vorgezogene Pilzdecken von *Torulopsis* aus dem im Nährmedium gebotenen Nicotinsäureamid größere Mengen Ammoniak freizusetzen, während unter den gleichen Bedingungen von *Endomycopsis* nur Spuren von Ammoniak gebildet werden. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es deshalb, den Stoffwechsel und die physiologische Rolle der als N-Quelle gebotenen beiden Pyridinderivate in diesen beiden Pilzen näher zu untersuchen. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die Nicotinsäure auf dem Tryptophan-Abbauweg und/oder über die Reaktion von Asparaginsäure mit einem C_3-Baustein in den Versuchsorganismen gebildet wird.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Versuchsorganismen und Kulturbedingungen

1. Stammkulturen

Versuchsorganismen waren die Pilze Endomycopsis vernalis Ludwig[1)] und Torulopsis utilis (Henneberg) Lodder[1)]. Beide Pilze wurden als Stammkulturen auf Malzagar (Schrägagarröhrchen) bei ca. 4°C im Kühlschrank gehalten. Zusammensetzung des Malzagars: 2 g Agar-Agar (gereinigt f. d. Bakteriologie, Fa. Merck), 4 g Biomalz (Fa. Fränkle & Eck O.H.G.), 3 mg Streptomycinsulfat (Fa. Grünenthal), ad 1oo ml deionisiertes Wasser.

2. Nährlösungen und Sterilisation

Die Anzucht der beiden Pilze wurde nach dem von S. HEIDE (1939) und H. RAAF (1941) beschriebenen Oberflächenkultur-Verfahren durchgeführt. Als Kulturgefäße dienten Petrischalen mit einem Durchmesser von 9 cm. Die Versuchsorganismen wurden auf der rein synthetischen Nährlösung nach W. WÖLTJE (1918) kultiviert:

1,o g L-Asparagin (f. bioch. Zw., Fa. Merck)

o,5 g Kalium-dihydrogenphosphat (n. SÖRENSEN, Fa. Merck)

[1)] C.J. ALEXOPOULOS (1966) zählt Endomycopsis taxonomisch zur Familie der Endomycetaceae (Endomycetales, Ascomycetes). W.I. KUDRJAWZEW (196o) dagegen trennt diese Gattung wie die aller Mycelpilze streng von den Hefen (=Ordnung: Einzellige Pilze). Torulopsis gehört nach dem erstgenannten Autor zur Gruppe der Fungi Imperfecti und wird in dieser der Familie der Cryptococcaceae (Moniliales, Deuteromycetes) zugeordnet. E.K. NOVAK u. J. ZSOLT (1961) dagegen führen Endomycopsis unter den Hansenulaceae und stellen diese zusammen mit den Cryptococcaceae unter eine Ordnung, die Endomycetales.

0,25 g Magnesiumsulfat · 7 H_2O (Fa. Merck)
7,5 g Saccharose reinst (Fa. Merck)
ad 1oo ml deionisiertes Wasser

Die Zusammensetzung dieser Grundnährlösung wurde entsprechend den einzelnen Versuchsanordnungen abgeändert, indem entweder die N-Quelle auf 1/2 oder 1/4 der normalen Menge (= N-arme Kultur) herabgesetzt oder die C-Quelle vermindert wurde. Weiterhin wurde je nach Versuchsanordnung L-Asparagin durch äquivalente Mengen anderer Aminosäuren ersetzt und in einigen Fällen Glycerin statt Saccharose als C-Quelle geboten. - Der pH-Wert der normalen Wöltje-Lösung lag bei Kulturbeginn zwischen 4,3 und 4,5. Wurden statt Asparagin andere Aminosäuren als N-Quelle eingesetzt, so wurde die Nährlösung mit 1 n HCl- oder 1 n NaOH-Lösung auf den vorgenannten pH-Wert eingestellt. Die Nährlösung wurde in einem Erlenmeyerkolben dreimal innerhalb von zwei bis drei Tagen im Dampftopf sterilisiert.

Bei den Nährmedien, die z.B. Chinolinsäure, Anthranilsäure oder Kynurenin als N-Quelle enthielten, mußte wegen einer möglichen Zersetzung der Verbindungen die Saccharose-Salzlösung isoliert sterilisiert und die N-Verbindung durch UV-Licht bestrahlt werden. Letztere wurde dann kurz vor dem Versuchsansatz unter keimfreien Bedingungen mit der Zucker-Salzlösung vereinigt. - Die Einstellung des pH-Endwertes der Nährlösung wurde in diesen Fällen durch Vorversuche mit kleinen Substanzmengen durchgeführt und die ermittelte Menge an 1 n HCl oder 1 n NaOH vor der Sterilisation zugesetzt.

3. Kulturansätze

Zur Gewinnung des Impfmaterials wurden die Organismen drei bis

vier Tage vor dem Ansatz einer Versuchsreihe von den Dauerkul= turröhrchen auf frische Schrägagarröhrchen übergeimpft. E n = d o m y c o p s i s v e r n a l i s wurde bei 18° bis 21°C und T o r u l o p s i s u t i l i s bei 21° bis 23°C im Dunkeln vorkultiviert. Bei diesen Temperaturen zeigen die beiden Pilze optimales Wachstum.

Unmittelbar vor dem Ansetzen der Versuchsreihen wurden die vor= gezogenen Hefen in ein Schüttelkölbchen übergeimpft (3o ml ste= rilisiertes Leitungswasser), und durch Schütteln eine homogene Suspension hergestellt. Jeweils o,5 ml dieser Aufschwemmung wurden zur Animpfung der Kulturschalen verwandt. —

Die Kulturschalen wurden folgendermaßen vorbereitet: In die Petrischalen wurden 34 g Quarzsand (gewaschen und geglüht, p.a., Fa. Merck)[2] eingewogen und im Trockenschrank 2 h lang bei 12o°C sterilisiert. Gleichzeitig wurden für jede Petrischale zwei Rundfilter mit einem Durchmesser von 8,8 cm (Weißband, Fa. Schlei= cher u. Schüll) sowie die nötige Anzahl Pipetten (2o ml und 2 ml Meßpipetten), Pinzetten und rechtwinkelig gebogener Glasstä= be trocken sterilisiert. - 14,5 ml der sterilen Nährlösung wur= den in die durch kreisende Bewegungen gleichmäßig verteilte Quarzsandschicht gegeben. Dann wurden nacheinander zwei Rund= filter auf die getränkte Quarzschicht gelegt. Hierauf wurde die Impfsuspension (o,5 ml) pipettiert und mit dem rechtwinkelig

[2] Nach Versuchsabbruch wurde der Quarzsand gesammelt, mit Lei= tungswasser gründlich gespült und jeweils zwei Stunden lang in verdünnter Salzsäure-Lösung und in verdünnter Carbonat-Lösung auf dem Wasserbad gekocht. Nach gründlichem Spülen - zuletzt in deionisiertem Wasser - und Trocknen bei 14o°C war der Sand wieder gebrauchsfertig.

gebogenen Glasstab sorgfältig auf der Filterpapier-Oberfläche verteilt. Gleichzeitig wurden hiermit die Luftblasen, die sich unter den Filterpapieren gebildet hatten und die ein unterschiedliches Wachstum der Pilze hervorrufen, entfernt. Die Versuchsorganismen wurden im Brutschrank bei jeweils optimaler Temperatur (siehe oben) im Dunkeln als sogenannte Aufwuchskulturen angezogen.

Neben den Aufwuchskulturen wurden auch Versuchsreihen mit sogenannten Umpflanzkulturen durchgeführt. Hierzu wurde das obere Filterpapier mit der ausgebildeten Pilzdecke von N-arm kultivierten Aufwuchskulturen auf ein neues Nährmedium umgepflanzt.

4. Ernte des Untersuchungsmaterials

Die Ernte der Pilze erfolgte meistens nach 2 1/2 bis 6 Tagen Kulturdauer im Abstand von ca. 12 h. Hierzu wurden drei bis fünf Pilzdecken mittels einer Pinzette auf die jeweiligen Schalendeckel übertragen und mit einem breiten Spatel quantitativ vom Rundfilter abgestreift. Das in einem kleinen Zentrifugengläschen mit bekanntem Leergewicht gesammelte Material wurde dreimal in eisgekühltem Wasser suspendiert und sofort zentrifugiert. Das nach dem letzten Waschgang erhaltene Pilzmaterial (Frischsubstanz) gelangte entweder direkt zur Untersuchung, wobei für die Gesamt-Nicotinsäure-Bestimmung kleine Portionen von 300 bis 600 mg ausgewogen und hydrolysiert wurden, oder es wurde zur späteren Präparation des Acetontrockenpulvers für die enzymatischen Untersuchungen bei -25°C eingefroren.

Zur Bestimmung des durchschnittlichen Trockengewichtes des geernteten Pilzmaterials einer Schale wurde zunächst das nach dem Waschgang erhaltene gesamte Frischmaterial gewogen. Danach wur-

den drei kleine Anteile (1oo bis 2oo mg) der mit einem Glasstab gut verrührten Frischsubstanz ausgewogen und bis zur Gewichtskonstanz in einem heizbaren Vakuumexsikkator bei 65° bis 7o°C getrocknet.

Die Restnährlösung wurde mit dem Waschwasser vereinigt - im folgenden Kulturfiltrat genannt -, sterilisiert und auf Nicotinsäure hin untersucht. Der pH-Wert des Kulturfiltrates wurde in der mit deionisiertem Wasser auf 5o ml aufgefüllten Restlösung mit einer Einstabmeßkette (pH-Meter der Fa. Knick) gemessen.

II. ANALYSENMETHODEN

1. Chromatographischer Nachweis der Nicotinsäure und ihres Amids

Zum qualitativen Nachweis der Nicotinsäure und des Nicotinsäureamids wurde der jeweilige Zellextrakt oder das Kulturfiltrat dünnschichtchromatographisch (Kieselgel-Cellulose-Mischung; 4 : 11) oder papierchromatographisch (Papier der Fa. Schleicher u. Schüll Nr. 2o43 b) getrennt. Hierzu diente als Laufmittel für die eindimensionale Chromatographie ein Butanol/Ammoniak (25%ig)/Wasser-Gemisch (1oo : 8 : 12; H. BÖDDEKER u. A.R. MISHKIN, 1963). Bei der zweidimensionalen Chromatographie wurde mit diesem Fließmittel in zweiter Richtung getrennt, während für die erste Laufrichtung ein Butanol/Eisessig/Wasser-Gemisch (4 : 1 : 1) verwandt wurde (J.K. CHAKRABARTI u. A.K. GUHA, 1956). Die getrockneten Chromatogramme wurden mit einer 5%igen alkoholischen p-Aminobenzoesäure-Lösung besprüht und danach aus konzentrierter Bromcyan-Lösung begast. Die Nicotinsäure-Flecken färben sich unter diesen Bedingungen rot bis rotbraun und die von Nicotinsäureamid orangerot. Ihre R_F-Werte sind im entspre-

chenden Ergebnisteil aufgeführt.

2. Quantitative Bestimmung der Gesamt-Nicotinsäure

Der Gehalt der Gesamt-Nicotinsäure in dem jeweiligen Untersuchungsmaterial wurde photometrisch nach der von H.C. GOLDTHORPE u. D. TIPPIT (1951) beschriebenen Methode bestimmt. Die Farbreaktion basiert auf der KÖNIGschen Reaktion von Pyridinderivaten mit Bromcyan und einem aromatischen Amin (W. KÖNIG, 1904): Der Pyridinring der Nicotinsäure wird durch Bromcyan aufgespalten und mit p-Methylaminophenol-sulfat zu einem gelbbraun gefärbten Polymethinfarbstoff kondensiert. Die Absorption des Farbstoffs wird bei 400 bis 410 nm im Spektralphotometer gemessen.

Diese Bestimmungsmethode wurde nach Vorversuchen folgendermaßen abgeändert: Das Pilzmaterial wurde durch alkalische Hydrolyse mit 1 n NaOH (ohne vorherige Behandlung mit Pepsin in salzsaurer Lösung) aufgeschlossen. Die Hydrolysendauer betrug 90 statt 60 min. Das alkalische Hydrolysat wurde zur Neutralisation solange tropfenweise mit 2 n HCl versetzt, bis ein Farbumschlag des meist braunen Aufschlusses nach grauweiß eintrat (pH-Bereich 6 bis 8). Das durch den Zusatz von Zinksulfat-Lösung entstandene schwachsaure Gemisch (pH-Bereich 3 bis 4), wurde durch langsame Zugabe von 1 n NaOH mittels einer Einstabmeßkette genau auf den pH-Wert 7,10 eingestellt (siehe S.31).

Das neutralisierte und auf 25 ml aufgefüllte Hydrolysat wurde zentrifugiert und die Lösung über Filterpapier dekantiert (Der Aufschluß ist einige Tage lang bei Aufbewahrung bei ± 0° bis 2° C haltbar). 3 ml des geklärten Hydrolysates wurden bei einem pH-Wert von 5,0 bis 5,2 (McIlvaine-Puffer) mit 4 ml einer 4%igen

Bromcyan-Lösung versetzt und unter Lichtausschluß 3o min lang bei 25 °C belassen. Dann wurden 14 ml einer 5%igen p-Methyl= aminophenolsulfat-Lösung (in o,1 n H_2SO_4) hinzugegeben und mit o,1 n H_2SO_4 auf das Volumen von 25 ml aufgefüllt. Nach 8o bis 12o min Reaktionsdauer bei einer Temperatur von 15°C wurde dann die Extinktion des Farbstoffes in 5 cm Küvetten bei einer Wellenlänge von 41o nm gegen den Blindwert gemessen und der Nicotinsäure-Gehalt an einer Eichgeraden abgelesen (siehe S. 26). Die Blindprobe enthielt alle Reagenzien außer der Bromcyan-Lösung (siehe Arbeitsvorschriften, S. 121).

3. Säulenchromatographische Anreicherung

Zum Nachweis der Nicotinsäure und ihres Amids bei den Markie= rungsversuchen mit Kohlenstoff-14 wurden die Mycelextrakte beziehungsweise die Kulturfiltrate mittels Ionenaustauscher von Begleitsubstanzen befreit und gleichzeitig angereichert [Dowex, 5o W X 8 (mesh 2oo bis 4oo, Fa. Serva)]. Hierzu wurde das Austauschharz zunächst gewaschen und in einer kleinen Säule (Schichthöhe 8 oder 12 cm, o,7 cm Durchmesser) mit 2 n HCl vor= behandelt. Nach Passage der zu untersuchenden Lösung durch die Säule wurde mit Wasser nachgespült. Die absorbierten Verbin= dungen wurden dann mit 2 n HCl eluiert. Die Füllung der Säule wurde nach jedem Versuch erneuert. Die aufgefangenen Fraktionen (1,5 ml) wurden zur Trockne eingeengt und mit wenig Wasser wie= der aufgenommen und dünnschichtchromatographisch analysiert.

Für die quantitative Bestimmung der Gesamt-Nicotinsäure im Kulturfiltrat wurden die nicotinsäurehaltigen Fraktionen ge= sammelt und zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde mit Wasser

aufgenommen, auf 15 ml aufgefüllt und in dieser Lösung die Nicotinsäure quantitativ bestimmt (siehe vorstehendes Kapitel).

4. Analysen mit ^{14}C-markierter Asparaginsäure

Für die Untersuchungen zur Biosynthese der Nicotinsäure wurde unter anderem ^{14}C-markierte Asparaginsäure eingesetzt. Die Anzucht der Hefe für diesen Versuch erfolgte in kleinen Petrischalen mit einem Innendurchmesser von 35 mm. In diese wurden zu 7,5 g Quarzsand 3 ml Nährlösung gegeben und jeder Ansatz mit o,1 ml Zellsuspension beimpft. Die Hefe wurde mit o,5% Asparagin in der Wöltje-Lösung vorgezogen und nach 4 Tagen auf ein Nährmedium umgepflanzt, das anstelle von inaktivem Asparagin ^{14}C(U)-L-Asparaginsäure (Fa. Buchler & Co) und als C-Quelle Glycerin enthielt. Die Ernte erfolgte nach 8 und 16 h Kulturdauer. Ausführliche Angaben zur Kultur werden bei dem entsprechenden Versuch im Ergebnisteil gegeben.

a) Nachweis von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid im aethanolischen Extrakt der Pilze

Das geerntete Material wurde dreimal mit Wasser gewaschen und sofort mit 7o%igem Aethanol 1o min lang auf dem Wasserbad (7o° bis 8o°C) extrahiert, zentrifugiert und das Zentrifugat über ein Filter abdekantiert. Der alkoholische Extrakt wurde im Vakuumeindampfgerät bei 2o°C bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde dann mit 2 ml 7o%igem Aethanol extrahiert und die filtrierte Lösung papierchromatographisch auf freie ^{14}C-markierte Nicotinsäure hin untersucht (siehe S.72). - Die Autoradiogramme wurden im Kontaktverfahren mit Agfa-Röntgenpapier

hergestellt. Zur chemischen Identifizierung der markierten Flecken wurde in diesen und in den weiter unten beschriebenen Analysen Co-Chromatographie mit Modellsubstanzen (Nicotinsäure und Nicotinsäureamid) durchgeführt.

b) Nachweis der Gesamt-Nicotinsäure im alkoholextrahierten Zellmaterial

Der Extraktionsrückstand wurde zur Untersuchung der gebundenen Nicotinsäure mit 1,5 ml 1 n NaOH auf dem Wasserbad 9o min lang hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde nach Neutralisation zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Der Überstand wurde zur Trockne eingeengt und dann mit Alkohol (96%ig) versetzt. Der aethanolische Extrakt wurde erneut bis zur Trockne eingedampft, mit 5 ml Wasser wieder aufgenommen und durch eine kleine Dowex-Säule (5o WX8, H-Form) gegeben. Die absorbierten Verbindungen wurden mit 2 n HCl eluiert und die einzelnen Fraktionen dünnschichtchromatographisch analysiert.

c) Nachweis der Gesamt-Nicotinsäure im Kulturfiltrat

Zur Untersuchung des Kulturfiltrates wurde die Restnährlösung mit der Waschflüssigkeit über eine kleine Dowex-Säule (5o WX8, H-Form) gegeben. Diese wurde mit 2 n HCl eluiert. Die vereinigten Fraktionen wurden papierchromatographisch und dünnschichtchromatographisch analysiert.

5.) Bestimmung des Gesamt-Stickstoffs im Pilzmaterial

Als Bezugswerte für den Nicotinsäure-Gehalt wurde neben der Pilztrockenmasse auch der Gesamt-N-Gehalt der Trockensubstanz ermittelt. Der Gesamt-Stickstoff wurde nach der Kjeldahl-Methode bestimmt. Für jede Analyse wurden 5 bis 12 mg Trocken-

substanz unter Zusatz von Selenreaktionsgemisch (Fa. Merck) mit konzentrierter Schwefelsäure naß verascht. Als Vorlage dienten 1o ml einer o,o1 n Schwefelsäure. Mit o,o1 n NaOH wurde unter Verwendung des Tashiro-Indikators (siehe Arbeits=vorschriften, S. 122) zurücktitriert.

6. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Nicotinsäure=amid-desamidase

a) Herstellung der Acetontrockenpulverextrakte

Zur Präparation der Acetontrockenpulver wurde das bei -25°C eingefrorene Pilzmaterial wiederholt kurzzeitig in ein heißes Wasserbad eingetaucht und die Pilzmasse solange mit dem Glas=stab gerührt, bis der Auftauprozeß abgeschlossen war. Dann wurde die Masse mit dem zehnfachen Volumen tiefgekühlten Ace=tons (-25°C) in den vorgekühlten Behälter des Homogenisators (MSE-Gerät) gespült und dreimal 15 s lang homogenisiert. Das Homogenat wurde durch zwei Blauband-Filter (Fa. Schleicher und Schüll) im Büchner-Trichter filtriert und der Rückstand nach dreimaligem Waschen mit tiefgekühltem Aceton mit einem Glasstab pulverisiert. Um das Acetonpulver völlig von Aceton zu befreien, wurde es in einem eisgekühlten Vakuumeindampfge=rät bei 3° bis 6°C und einem Druck von 2o bis 6o mm Hg-Säule unter Durchleitung eines schwachen, getrockneten Luftstroms 1 h lang bis zur vollständigen Acetonfreiheit belassen. Das Pulver wurde über Phosphorpentoxyd und Paraffin im Vakuumexsik=kator bei ± 0° bis 2°C gelagert. Es war nach ca. 12 h für die enzymatischen Untersuchungen verwendbar.

Zur Gewinnung des Acetonpulverextraktes wurden 75 mg (T o r u = 1 o p s i s) beziehungsweise 225 mg Acetontrockenpulver (E n =

d o m y c o p s i s) in 7,5 ml bidestilliertem Wasser oder Pufferlösung (nähere Angaben bei den einzelnen Versuchsansätzen) unter Eiskühlung 6 min lang suspendiert. Danach wurde bei 2° bis 4°C mit 5ooo · g 1o min lang zentrifugiert und der Überstand durch Watte in ein eisgekühltes Reagenzglas dekantiert. Zum Nachweis der Enzymaktivität wurden o,5 ml dieses Extraktes pro Analyse eingesetzt.

b) Nachweis der Desamidase-Aktivität

Da als Reaktionsprodukt bei der enzymatischen Desamidierung von Nicotinsäureamid neben der Nicotinsäure in stöchiometrischem Verhältnis Ammoniak in ungebundener Form entsteht, kann die Nicotinsäureamid-desamidase-Aktivität durch die Bestimmung der gebildeten NH_3-Menge auf einfache Weise nachgewiesen und berechnet werden. Zur NH_3-Bestimmung wurde die von E.J. CONWAY (1962) beschriebene Mikrodiffusions-Methode angewandt (siehe Arbeitsvorschriften, S.123). Jede Analyse wurde in zwei Parallelansätzen durchgeführt. Der Blindwert wurde entweder aus Ansätzen mit denaturiertem Extrakt ermittelt oder als Summe der einzeln bestimmten Werte der Enzym-Cofaktor-Lösung und der Substrat-Lösung erhalten.

Als enzymatische Reaktions-Lösung wurden in eisgekühlten Halbmikroreagenzgläsern zusammengegeben: o,5 ml Acetonpulver-Extrakt; 1o µMol Nicotinsäureamid (p.a., Fa. Merck); 5 µMol Magnesiumsulfat · 7 H_2O (Fa. Merck); 5 µMol Adenosin-5-triphosphat-Na-Salz (Fa. Boehringer)[3]. Die Reaktionen wurden in o,o5

---

[3] Mg^{++} und ATP wurden nur bei den ersten Untersuchungen den Reaktionslösungen zugesetzt, da sich später herausstellte, daß beide Zusätze unter den vorliegenden Versuchsbedingungen die Enzymwirkung nicht beeinflussen.

molaren Pufferlösungen (die Puffer sind bei den einzelnen Versuchsansätzen näher beschrieben) bei 1 ml Gesamtvolumen ausgeführt. Die Inkubationszeit im Ultrathermostaten (Fa. Haake, Typ NBS) betrug bei den Untersuchungen von T o r u = l o p s i s - Extrakten 1 h bei 37°C und bei denen von E n = d o m y c o p s i s - Extrakten 2 h bei 3o°C (siehe hierzu die Untersuchungen auf S.8o). Nach der Inkubation wurden die An= sätze sofort in Eiswasser gestellt und zur Bestimmung des Am= moniakgehaltes nach der oben genannten Mikrodiffusionsmethode in die CONWAY-Schalen übertragen. Nach mindestens 12 h Diffu= sionsdauer wurde das in dem zentralen Borsäure-Indikator-Gefäß absorbierte Ammoniak mittels Titration mit o,o1 n HCl bestimmt (E.J. CONWAY, 1962). Mit dieser Methode können Ammoniakmengen von weniger als 1 µg noch genau ermittelt werden.

Die spezifische Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase wur= de in µMol gebildeten Ammoniakspro mg Eiweiß und Zeiteinheit berechnet.

c) Eiweißbestimmung des Acetonpulver-Extraktes

Der Proteingehalt des Acetonpulver-Extraktes wurde nach der von O.H. LOWRY und Mitarb. (1951) beschriebenen Methode photo= metrisch bestimmt (siehe Arbeitsvorschriften, S. 124). Zu die= sem Zweck war es nötig, die Extrakte so zu verdünnen, daß zwi= schen 2o und 4o µg Protein/ml zu einer Analyse eingesetzt wer= den konnten. Der Verdünnungsgrad der verschiedenen Extrakte richtete sich dabei nach der zur Extraktion eingewogenen Trok= kenpulvermenge, nach dem Versuchsorganismus und nach dem Ern= tezeitpunkt der Hefen. Die Extinktion der Reaktionslösung wur= de im Spektralphotometer (PMQ II, Fa. Zeiss) bei 75o nm gegen

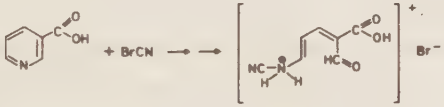
einen Blindwert aus Wasser und Reagenzlösung gemessen und der Proteingehalt aus einer Eichkurve entnommen.

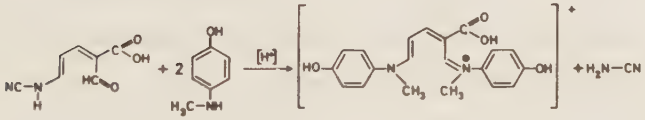
C. ERGEBNISSE

I. VORUNTERSUCHUNGEN ZUR QUANTITATIVEN NICOTINSÄUREBESTIMMUNG

Zur Gehaltsbestimmung der Nicotinsäure in natürlichem Material wird in der Literatur eine größere Anzahl biologischer und chemischer Verfahren angegeben. Obwohl einige der biologischen Methoden sich durch ihre Empfindlichkeit und hohe Spezifität auszeichnen, sind sie jedoch für Reihenuntersuchungen zu zeitaufwendig. Die chemischen Methoden zur Vitaminbestimmung können zwar wesentlich schneller durchgeführt werden, beruhen aber auf einer für Nicotinsäure unspezifischen Reaktion. Deshalb sollten die Analysenbedingungen für die nachfolgenden Untersuchungen an den beiden Versuchsorganismen überprüft werden.

Die chemischen Verfahren haben meistens die Reaktion nach W. KÖNIG (1904a; 1904b) zur Grundlage: Aus 1,2-unsubstituierten Pyridinderivaten (mit Ausnahme von α-Picolin) entstehen nach Ringspaltung durch Bromcyan (siehe dazu S. CREYF u. L. ROOSENS, 1957) in Gegenwart von primären oder sekundären aromatischen Aminen gefärbte Polymethinkondensate, die spektralphotometrisch gemessen werden (vgl. T. ZINCKE, 1904) :





Die Reaktion ist nicht spezifisch für Nicotinsäure. Andere Substitutionen am Pyridinring bewirken meistens nur eine kurze Verschiebung des Absorptionsbereiches des gebildeten Farbstoffes (B.P. LISBOA, 1957; W. NIELSCH, 1958). Die auf diesen Reaktionen aufbauenden Bestimmungsmethoden können dennoch zur Vitaminbestimmung in biologischem Material herangezogen werden, weil in diesem praktisch nur Nicotinsäurederivate vorkommen, die durch Hydrolyse in die Säure übergeführt werden können (z.B. Nicotinsäureamid, Nicotinursäure, Pyridinnucleotide usw.). - Die Bestimmungsverfahren unterscheiden sich voneinander durch das zur Kondensation mit dem intermediär entstehenden Glutacondialdehydderivat eingesetzte Amin (siehe u.a. M. SWAMINATHAN, 1938; L.J. HARRIS u. W.D. RAYMOND, 1939; E.C. BARTON-WRIGHT u. R.G. BOOTH, 1944) oder durch die modifizierten Reaktionsbedingungen (z.B. E. BANDIER u. J. HALD, 1939; W.J. DANN u. P. HANDLER, 1941;

T.E. FRIEDEMANN u. E.I. FRAZIER, 195o; H.C. GOLDTHORPE u. D. TIPPIT, 1951; B. GASSMANN u. K. TÄUFEL, 1958a; E.N. STEPANOVA, 1963) und die Art der Blindwertmessung.

Die Aminkomponente bedingt den Farbton und die Farbintensität des entstehenden Polymethinkondensates. Sie beeinflußt auch die Stabilität des Farbstoffs. Weiterhin ist die maximale Farbstoffbildung vom pH-Wert, der Temperatur und der Konzentration der Reagenzien während der beiden Reaktionsschritte abhängig (vgl. H.C. GOLDTHORPE u. D. TIPPIT, 1951; B. GASSMANN u. K. TÄUFEL, 1958a). Da durch die Aufarbeitung von biologischem Material für eine Gesamt-Nicotinsäure-Bestimmung die Extrakte oder Hydrolysate mehr oder weniger starke Eigenfärbung aufweisen, ist auch diese zu beachten.

Viele der auf der Bromcyanreaktion beruhenden Bestimmungsvorschriften haben sich wegen der geringen Beständigkeit des Farbstoffs als unbrauchbar erwiesen. Nachteilig für Reihenuntersuchungen wirken sich Ausschüttel- und andere Anreicherungsverfahren aus. - Die folgenden Untersuchungen wurden mit dem Ziel angestellt, eine für unser Versuchsmaterial geeignete und empfindliche quantitative Bestimmungsmethode für die Gesamt-Nicotinsäure zu finden.

Vorversuche zur Bestimmung des Gesamt-Nicotinsäure-Gehaltes in Pilzhydrolysaten von E n d o m y c o p s i s und T o r u l o p s i s zeigten, daß die von R. STROHECKER (Fa. Merck A.G., 1959) angegebene Bromcyan-Anilin-Methode (modifiziert nach K. RITSERT, 1939) unbrauchbar ist. Einmal scheinen Fehlerquellen bei der methanolischen Hydrolysatklärung und bei der butanolischen Farbstoffextraktion aufzutreten und zum anderen wirkt sich das Ausschüttelverfahren mit Butanol hinsichtlich des sehr unbeständigen Farbstoffs nachteilig aus. - Das Bestimmungsverfahren nach Ö. HEVER (1961) mit Kaliumcyanid und Benzolsulfonsäure-chloramid-Natrium ergab offenbar wegen der raschen Zersetzung des Farbstoffs keine reproduzierbaren Werte.

H.C. GOLDTHORPE u. D. TIPPIT (1951) setzten bei der Nicotinsäure-Bestimmung als Amin das p-Methylaminophenol-sulfat ein (siehe u.a. auch B. GASSMANN, 196o; E.N. STEPANOVA, 1963). Da der mit dieser Aminkomponente gebildete Farbstoff über mehrere Stunden hinweg beständig ist und Vorversuche recht gute

Ergebnisse zeigten, wurde diese Methode eingehend geprüft.

Bestimmungen mit Standardlösungen: Bei den Analysen reiner Nicotinsäurelösungen wurden unter den von H.C. GOLDTHORPE u. D. TIPPIT angegebenen Bedingungen die in Tab. 1 aufgeführten Extinktionen gemessen. Aus diesen errechnet sich die Extink=

Tabelle 1: Photometrische Gehalts-Bestimmung einer Nicotin=säure-Standardlösung. Reagenzien: 4 ml Bromcyan-Lösung (4 g/1oo ml wässriger Lösg.) und 14 ml Metolsulfat-Lösung (5 g/1oo ml o,1 n H_2SO_4); Probelösung: 3 ml Nicotinsäure-Lösung (1,3 mg/ 1ooo ml wässriger Lösg.).

Ansatz Nr.	Extinktionen			Extinktions=differenz
	Reagenzien E_R	Probe=lösung. E_P	Probelösg. + Reagenz. E_{PR}	$\Delta E = E_{PR} - (E_R + E_P)$
1	o,o7o	o,oo2	o,278	o,2o6
2	o,o66	o,ooo	o,277	o,211
3	o,o66	-)o,oo2	o,272	o,2o8
4	o,o64	-)o,oo2	o,277	o,215
5	o,o68	o,ooo	o,283	o,215
6	o,o66	o,oo1	o,28o	o,213

tion des mit Nicotinsäure gebildeten Farbstoffes (ΔE) als Diffe=renz zwischen dem Wert der Reaktionslösung (E_{PR}) und der Summe der beiden Blindwerte (E_R und E_P). Die Fehlerbreite beträgt weniger als 5%. - Werden die Extinktionen steigender Nicotin=säure-Konzentrationen in einem Koordinatensystem aufgetragen, so erfüllt die erhaltene Gerade das BOUGUER-LAMBERT-BEERsche Gesetz in dem gemessenen Konzentrationsbereich von o,5 bis 2o µg Nicotinsäure in 25 ml Reaktionslösung (Abb. 2).

Das Absorptionsspektrum des mit 4 µg Nicotinsäure gebildeten Farbstoffs im Wellenbereich von 33o bis 51o nm ist in Abb. 3

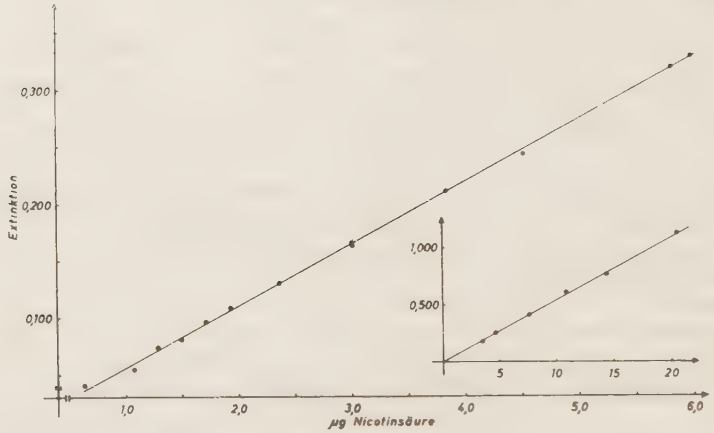


Abbildung 2: Eichkurve für die Nicotinsäure-Bestimmung nach der Bromcyan-Metol-Methode

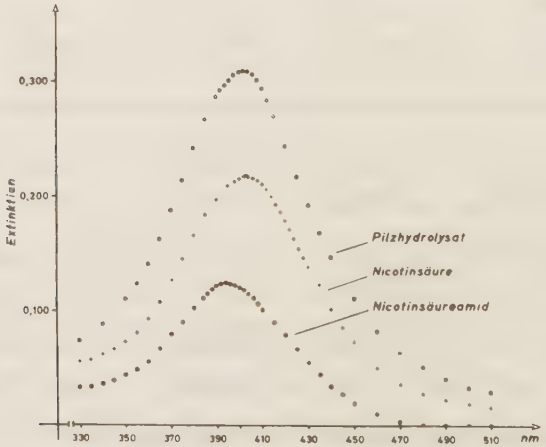


Abbildung 3: Absorptionskurven der bei der Bromcyan-Metol-Reaktion gebildeten Farbstoffe aus Nicotinsäureamid, Nicotinsäure und einem Pilzhydrolysat von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s . Wellenbereich 33o bis 51o nm

(siehe "Nicotinsäure") wiedergegeben. Das Absorptionsmaximum liegt bei 4o3 nm. Im Vergleich dazu wurde die Absorptionskurve des aus 4 µg Nicotinsäureamid gebildeten Polymethinfarbstoffs aufgenommen (siehe "Nicotinsäureamid"). Sie hat ein Maximum bei 394 nm, dessen Extinktion aber nur 3/5 des Wertes des aus der gleichen Menge Nicotinsäure gebildeten Farbstoffs beträgt. Da bei dem alkalischen Aufschluß des Zellmaterials die Nicotinsäure-Verbindungen (u.a. Nicotinsäureamid und die Pyridinnucleotide; vgl. B. GASSMANN u. K. TÄUFEL, 1958b) vollständig in die Säure umgewandelt werden, wird mit dieser Methode der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt erfaßt (siehe Abb.3, "Pilzhydrolysat").

Pyridyl-3-carbinol und Chinolinsäure: In jüngster Zeit ist eine weitere bromcyan-positive Substanz in Mikroorganismen festgestellt worden (E. MOTHES, 1964). Sie wurde von D. GROSS u. Mitarb. (1967) als 3-Hydroxymethylpyridin, das von zahlreichen M y c o b a c t e r i u m - Arten in unterschiedlicher Menge gebildet wird, identifiziert. Es schien deshalb zweckmäßig zu sein zu prüfen, ob 3-Hydroxymethylpyridin bei der Nicotinsäure-Bestimmung unter den oben genannten Analysenbedingungen mit erfaßt wird. Zu diesem Zweck wurden 8 µg Pyridyl-3-carbinol (Fa. Schuchardt) pro 25 ml Gesamt-Lösung zur Reaktion mit Bromcyan und Metol eingesetzt und die Absorption bei 41o nm gemessen. Die in Tab.2 wiedergegebenen Analysenwerte zeigen, daß das Reaktionsprodukt aus 3-Hydroxymethylpyridin praktisch keine Absorption aufweist (Differenz $\Delta E_{\text{Ansatz 1 und 2}} = o,oo8$). Es fällt

Tabelle 2: Absorption von Pyridyl-3-carbinol bei 41o nm nach Reaktion mit Bromcyan und Metol.

Ansatz Nr.	Zusammensetzung der Analysenansätze			Extinktionen
	Pyridyl-3-carbinol 8 µg in 3 ml H_2O	BrCN-lösung (4%ig)	Metol in o,1 n H_2SO_4 (5%ig)	
1	-	+	+	o,o68
2	+	+	+	o,o76
3	+	+	-	o,o25
4	+	-	+	o,o64

aber die verhältnismäßig hohe Extinktion der Lösung von Kolben Nr.3 (Analysenlösung und BrCN-Lösung) auf (vgl. Ansatz 2 und 3 in Tab.3, S. 28). Wahrscheinlich ist das Reaktionsprodukt aus Bromcyan und Pyridyl-3-carbinol farbintensiver als das Produkt der Bromcyan-Nicotinsäure-Reaktion (siehe dazu D. GROSS u. Mitarb., 1967); nach Zugabe des Amins setzt sich das Carbinolderivat über ein instabiles Metolkondensat zu einer ungefärbten Verbindung weiter um. - Ein zwischen 33o und 55o nm aufgenommenes Spektrum dieser Lösung zeigt im ganzen Wellenbereich keine Absorption. - Hieraus ergibt sich, daß 3-Hydroxymethylpyridin die Gesamt-Nicotinsäure-Bestimmung nach dieser Methode nicht stört.

In gleicher Weise wurde auch der Einfluß der Chinolinsäure (Pyridin-2,3-dicarbonsäure) auf die Nicotinsäureanalyse untersucht. Hierzu wurden 1o µg Chinolinsäure in 2 ml 1 n NaOH 9o min lang erhitzt und dann nach der Nicotinsäure-Bestimmungsmethode analysiert. Es wurde keine nennenswerte Absorption bei 41o nm gemessen und auch ein Spektrum im Bereich von 35o bis 45o nm weist keine Absorptionsbande auf.

Bestimmungen mit Zellhydrolysaten: Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von Nicotinsäure in dem alkalischen Hydrolysat der Pilztrockensubstanz von E n d o m y c o p s i s sind in Tab.3 wiedergegeben worden. Die Extinktionen der Ansätze wurden gegen die Puffer-Lösung (mit o,1 n H_2SO_4-Zusatz) gemessen (An=

Tabelle 3: Absorption des Pilzhydrolysates, der Reagenzlösungen und der Reaktionslösung mit steigendem Nicotinsäure-Zusatz (= Standard) bei 41o nm.

Ansatz*) Nr.	Hydrolysat	Standard 1,2 µg Nic'sre. pro o,1ml	BrCN-Lösung (4%ig)	Metol in o,1n H_2SO_4 (5%ig)	Extinktionen
1	- (H_2O)	-	- (H_2O)	-	o,ooo
2	3 ml	-	- (H_2O)	-	o,o4o
3	3 ml	-	4 ml	-	o,o43
4	3 ml	-	- (H_2O)	14 ml	o,1o4
5	3 ml	-	4 ml	14 ml	o,269
6	3 ml	o,1 ml	4 ml	14 ml	o,335
7	3 ml	o,2 ml	4 ml	14 ml	o,4o3
8	3 ml	o,3 ml	4 ml	14 ml	o,468

*) Alle Ansätze wurden mit o,1 n H_2SO_4 auf 25 ml ergänzt.

satz Nr.1). Das Hydrolysat allein (Nr.2) hat eine Extinktion von E_2 = o,o4o und die Lösung mit Bromcyan-Zusatz (Nr.3) eine solche von E_3 = o,o43. Der Zusatz von Bromcyan zum Hydrolysat bewirkt eine nur sehr geringe Extinktionsveränderung, die vernachlässigt werden kann. - Die Extinktion von Ansatz Nr.4 (E_4 = o,1o4) setzt sich aus der Eigenabsorption des Hydrolysates E_2 = o,o4o und der Metolabsorption E = o,o64 (= E_4-E_2; vgl. Ansatz Nr.5 in Tab.4) zusammen. Es zeigt sich, daß der Zusatz des Amins zur Reaktionslösung (außer der Eigenabsorption) keine weitere Absorption verursacht. - Die Extinktion des Ansatzes Nr.5 (E_5 = o,269) gibt den Absorptionswert des eigentlichen Analysenansatzes wieder. Durch Subtraktion der Extinktionen E_4 + (E_3-E_2) vom Extinktionswert des Analysenansatzes E_5 wird aus diesem die Absorption des gebildeten Nicotinsäurefarbstoffs erhalten.

Die Ansätze Nr.6, 7 und 8 enthalten steigende Zusätze einer Nicotinsäure-Standard-Lösung (jeweils zusätzlich 1,2 µg Nicotinsäure in o,1 ml H_2O) zum Hydrolysat. Die Analysen sollten zeigen, ob das Hefehydrolysat die quantitative Erfassung der Nicotinsäure beeinflußt. Hierbei stellte sich heraus, daß für die Hydrolysate mit den Nicotinsäure-Zusätzen der gleiche Kurvenanstieg erhalten wurde wie für die Ansätze mit den reinen Nicotinsäure-Lösungen (siehe Abb.2). - Ein zwischen 33o bis 51o nm aufgenommenes Absorptionsspektrum entspricht dem mit reiner Nicotinsäure erhaltenen (siehe Abb.3, "Pilzhydrolysat").

Die quantitative Bestimmung der Gesamt-Nicotinsäure in dem Pilzmaterial mittels dieser Extinktionsmessungen wird also nicht durch störende Substanzen des Hydrolysates verfälscht.

Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen: In Tab.4 ist die Eigenabsorption der Lösung mit verschiedenen Metol-Konzentrationen wiedergegeben. Der durchschnittliche Extinktionswert einer 5 Gew.%igen Metollösung liegt unter diesen Bedingungen bei o,o66. Er wird durch den Zusatz von 4 ml BrCN-Lösung (4 g/1oo ml Lösg.) nur geringfügig verändert.

Tabelle 4: Die Absorption der Reagenzien bei 41o nm bei unterschiedlichem Metol-Gehalt.

Ansatz*) Nr.	Zusammensetzung der Lösungen				Extinktionen
	Deionis. Wasser ml	McIlvaine-Puffer (pH 5,25) 3 ml	BrCN-Lösg. (4%ig) 4 ml	Metol in o,1 n H_2SO_4 14 ml	
1	7	+	- (H_2O)	4%	o,o51
2	3	+	+	4%	o,o53
3	7	+	- (H_2O)	-	o,oo4
4	3	+	+	5%	o,o62
5	7	+	- (H_2O)	5%	o,o68
6	3	+	+	6%	o,o75
7	7	+	- (H_2O)	6%	o,o79

*) Alle Ansätze wurden mit o,1 n H_2SO_4 auf 25 ml ergänzt.

H.C. GOLDTHORPE u. D. TIPPIT (1951) stellten für die Bromcyan-Nicotinsäure-Reaktion (3o min bei 25° C) eine pH-Optimumskurve auf. Die höchsten Werte wurden im pH-Bereich von 4,9 bis 5,3 gemessen. B. GASSMANN u. K. TÄUFEL (1958a) führten diese Reaktion bei einem pH-Wert von 4,5 durch (5 min bei 75° C). Um zu ermitteln, bei welchem pH-Wert die Reaktion bei den Hefehydrolysaten optimal erfolgt, wurden 3 ml Zellhydrolysat mit McIlvaine-Puffer auf die in Abb.4 angegebenen pH-Werte eingestellt und die Analyse unter diesen veränderten Bedingungen durchge-

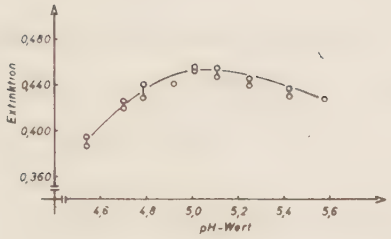


Abbildung 4: Der Einfluß des pH-Wertes bei der Bromcyan-Reaktion auf die Farbstoffbildung aus Nicotinsäure

führt. In dem pH-Bereich um 5,1 wurden die höchsten Polymethinfarbstoff-Extinktionen gemessen. Gegenüber diesen sind die Extinktionswerte des bei einem pH-Wert von 4,5 gebildeten Farbstoffes um etwa 14% vermindert. Die mit dem Pilzhydrolysat gefundenen Absorptionsmaxima stimmen demnach mit den von H.C. GOLDTHORPE u. D. TIPPIT gefundenen überein.

Durch weitere Vorversuche konnte bestätigt werden, daß zur Reproduzierbarkeit der Extinktionsmessungen das Zellhydrolysat bei der Zinkhydroxyd-Fällung genau auf den pH-Bereich von 7,o bis 7,2 eingestellt werden muß.

Z u s a m m e n f a s s u n g: Die Anwendung der Methode nach H.C. GOLDTHORPE u. D. TIPPIT zur Bestimmung des Gesamt-Nicotinsäure-Gehaltes in den Pilzen E n d o m y c o p s i s und T o r u l o p s i s bringt nach den durchgeführten Untersuchungen reproduzierbare Ergebnisse. Die Analysenwerte der Nicotinsäure-Standard-Lösungen schwanken zwischen ± 2%, während die Bestimmungen im Zellhydrolysat maximal um etwa 8% diffe-

rieren. - Die Anwendung von p-Methylaminophenol als Amin zur Farbstoffbildung bringt gegenüber vielen in der Literatur vorgeschlagenen Aminen eine erhöhte Farbintensität und Farbstabilität des aus Nicotinsäure gebildeten Polymethinderivates. Es können noch 0,5 µg Nicotinsäure /25 ml Reaktionslösung bestimmt werden; noch nach 6 h ist der Extinktionswert der Lösung unverändert.

Nach den Ergebnissen der Vorversuche kann das Analysenverfahren und damit die Berechnung des Nicotinsäure-Gehaltes dahingehend vereinfacht werden, daß der Blindwert nur mit einem Ansatz, der außer der Bromcyanlösung alle Zusätze enthält, bestimmt wird.

Bei vergleichenden Untersuchungen zur Klärung der Zellaufschlüsse mittels der Zinkhydroxydfällung sind die zuverlässigsten Ergebnisse dann erreicht worden, wenn das alkalische Hydrolysat zunächst schwach angesäuert wurde (pH-Wert 3 bis 4) und dann nach Zugabe von Zinksulfat tropfenweise mit 1 n NaOH-Lösung auf den pH-Wert 7,1 eingestellt wurde. Eine ungenaue Befolgung dieser Vorschrift führt zu erheblichen Fehlerquellen.

Nach A.E. TEERI (1952) bildet auch Pyridoxin bei erhöhter Temperatur mit Bromcyan und einem Amin einen Polymethinfarbstoff. B. GASSMANN u. K. TÄUFEL (1958a) zeigten jedoch, daß die Absorption dieser Verbindung die Nicotinsäure-Werte nur in geringem Maße (0,0034 mg %) verfälscht, so daß unter den vorliegenden Bedingungen kein messbarer Einfluß vorhanden ist. Gegen das Vorhandensein von 3-Hydroxymethylpyridin in unseren Versuchsorganismen - zumindest in größeren Mengen - spricht die Beobachtung, daß außer Nicotinsäure und ihrem Amid auf Chro-

matogrammen keine anderen Bromcyan-positiven Flecken auftreten; 3-Hydroxymethylpyridin bildet mit Bromcyan und Metol keinen Farbstoff (vgl. B. KAKAC u. Z.J. VEJDELEK, 1963). Auch Chinolinsäure gibt mit Bromcyan und Metol keinen Farbstoff und stört nicht die Nicotinsäure-Bestimmung.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, daß mit der von H.C. GOLDTHORPE u. D. TIPPIT (1951) beschriebenen Methode, die in einigen Punkten abgewandelt wurde, bei der Bestimmung des Gesamt-Nicotinsäure-Gehaltes in den Versuchsorganismen reproduzierbare Werte erhalten werden. Die Methode ist empfindlich und zeichnet sich durch eine große Beständigkeit des gebildeten Polymethinfarbstoffes aus.

II. DER GESAMT-NICOTINSÄURE-GEHALT VON E N D O M Y C O P S I S V E R N A L I S UND T O R U L O P S I S U T I L I S IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KULTURDAUER UND DER N-QUELLE

Quantitative Nicotinsäure-Bestimmungen an Hefepilzen sind besonders bei Arten durchgeführt worden, die als Bestandteil von Nahrungs- und Futtermitteln Bedeutung erlangt haben oder als Vitaminquelle von pharmazeutischem Wert sind. So werden z.B. für C a n d i d a a r b o r e a Werte zwischen 157 und 58o µg Nicotinsäure/g Trockensubstanz angegeben (W. CHANG u. W.H. PETERSON, 1949), für Bierhefe 3oo bis 1ooo µg (Zus.fass. siehe A.A. EDDY, 1958). Der Grund für diese großen Streuungen des Nicotinsäure-Gehaltes liegt einmal darin, daß die untersuchten Hefen offensichtlich verschiedenen Rassen angehörten (siehe hierzu H.J. BUNKER, 1963), zum anderen sind die Bestimmungen nach unterschiedlichen Kulturbedingungen (A.J. WILEY u. Mitarb., 195o; H. SUOMALAINEN u. Mitarb., 1965) und nach verschiedener Kulturdauer (T. SATO u. H. MATSUSHITA, 1961; Y. SUZUKI, 1961) durchgeführt worden. J.C. LEWIS u. Mitarb. (1944) konnten zeigen, daß Kulturen von T o r u l o p s i s u t i l i s , die in verschiedenen Medien (Fruchtsäfte und Melassen) gezogen wurden, eine beträchtliche Differenz im Nicotinsäure-Gehalt der Trockensubstanz aufwiesen (siehe auch A.J. WILEY u. Mitarb., 195o). Weiterhin berichtete K. WIHERVAARA (1967), daß die synthetisierte Menge Nicotinsäure einer Bäckerhefen-Kultur von dem N-Gehalt des vollsynthetischen Nährmediums abhängig ist.

Nach diesen Befunden war es für die Untersuchung über den Stoffwechsel der Nicotinsäure in E n d o m y c o p s i s v e r =

n a l i s notwendig, zunächst den Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt dieses Organismus in Abhängigkeit von der Kulturdauer und der N-Quelle zu bestimmen. Da die sogenannte Eiweißhefe T o r u = l o p s i s u t i l i s bei der Eiweiß- und Fettsynthese, der Spaltung und Nutzung von Acylamiden und der Harnstoffassi= milation sich anders verhält als die Fetthefe E n d o m y = c o p s i s v e r n a l i s (H. KATING, 1959; M. STEINER u. H. KATING, 196o; 1961), sollte in Parallelversuchen geprüft werden, ob beide Organismen unter gleichen Kulturbedingungen auch im Nicotinsäure-Gehalt Unterschiede zeigen.

1. Gesamt-Nicotinsäure im Mycel der Aufwuchskulturen von E n = d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p = s i s u t i l i s

Versuchsanordnung: Die beiden Versuchsorganismen E n d o m y = c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p s i s u t i = l i s wurden als Oberflächenkulturen auf Wöltje-Nährlösung (mit 1% Asparagin als N-Quelle) kultiviert. Die Ernte der Pil= ze erfolgte zu den in Tab.5 und 6 angegebenen Zeiten. Die Be= stimmung der Trockensubstanz, des Gesamt-N und der Nicotinsäu= re sind im Methodenteil (S.14) ausführlich beschrieben.

a) E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : Für viele Orga= nismen ist Asparagin eine gute N-Quelle. Auch E n d o m y = c o p s i s wächst auf ihr optimal (H. KATING, 1955 a). Die Trockensubstanzproduktion steigt während der ersten 4 Kultur= tage rasch an (Tab.5, Spalte 2) und nimmt dann infolge Erschöp= fung des Nährmediums nur noch geringfügig zu. Auch der abso= lute Gesamt-N-Gehalt (Spalte 3) der Trockensubstanz einer Kul= turschale steigt während der ersten 4 Tage stetig an. Wird der prozentuale N-Gehalt errechnet, so zeigt sich jedoch (Spalte 4), daß die junge Kultur am N-reichsten ist (siehe hierzu die aus= führlichen Untersuchungen von S. HEIDE, 1939; H. RAAF, 1941;

M. STEINER u. H. KATING, 196o).

Tabelle 5: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : Trocken = substanz, Gesamt-Stickstoff- und Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Mittelwerte aus drei Parallel= kulturen.

Kultur= dauer h	Trocken= substanz mg	Gesamt-N mg	N-Gehalt d. Trok= kensubst. %	Gesamt- Nicotin= säure µg	Nicotinsre. in 1 g Trockensub= stanz (p.p.m.) µg
52	53	4,1	7,8	12,1	229
61	1o6	7,8	7,4	21,8	2o6
85	222	13,5	6,1	46,o	2o6
114	319	18,1	5,7	58,7	184
131	355	18,2	5,1	56,8	16o
158	349	19,7	5,6	53,4	153

Sieht man von geringen Schwankungen ab, so steigt der absolute Nicotinsäure-Gehalt (Spalte 5) pro Kulturschale (Maximum nach 114 h) gleichsinnig mit der Trockensubstanz-Produktion und dem N-Gehalt an. Wird der Nicotinsäure-Gehalt für 1 g Trockensub= stanz errechnet (Spalte 6), so ergibt sich in Analogie zu dem prozentualen N-Gehalt, daß die junge E n d o m y c o p s i s - Kultur mit 229 µg den höchsten Nicotinsäure-Gehalt hat. Mit zunehmendem Alter nimmt der Nicotinsäure-Gehalt ab und beträgt nach 158 h Kulturdauer nur noch 153 µg.

b) T o r u l o p s i s u t i l i s : J.C. LEWIS (1944) hat in einer Submerskultur von T o r u l o p s i s u t i l i s (Stamm Y 9oo) in vollsynthetischem Nährmedium 1ooo bis 12oo µg Nicotinsäure/g Trockensubstanz gefunden. Der gleiche Stamm hat nach Kultur in verschiedenen Fruchtsäften und -melassen 44o bis 61o µg Nicotinsäure (J.C. LEWIS u. Mitarb., 1944; siehe auch K. MYSZKOWSKA u. Mitarb., 196o).

Die Ergebnisse der Trockensubstanz-, Gesamt-N- und Gesamt-Nicotinsäure-Bestimmung einer auf Wöltje-Nährlösung gezogenen Oberflächenkultur des von uns verwandten Stammes von T o r u l o p s i s u t i l i s sind in Tab.6 zusammengestellt worden. T o r u l o p s i s zeigt unter gleichen Kulturbedingungen ein etwa gleich rasches Wachstum wie E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s (Spalte 2, siehe auch M. STEINER u. H. KATING, 1960). Nach 109 h Kulturdauer nimmt die Trockensubstanz-Bildung praktisch nicht mehr zu; die N-Assimilation ist nur noch gering (Spalte 3); der prozentuale N-Gehalt der Trockensubstanz fällt wie bei der E n d o m y c o p s i s -Kultur mit fortschreiten-

Tabelle 6: T o r u l o p s i s u t i l i s : Trockensubstanzbildung, Gesamt-Stickstoff- und Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Mittelwerte aus drei Parallelkulturen.

Kulturdauer h	Trockensubstanz mg	Gesamt-N mg	N-Gehalt d.Trokkensubst. %	Gesamt-Nicotinsäure µg	Nicotinsre. in 1 g Trockensubstanz (p.p.m.) µg
48	67	4,2	6,3	15,8	236
60	147	7,9	5,4	32,2	219
70	207	11,6	5,6	55,2	267
83	251	13,3	5,3	79,4	316
95	278	14,7	5,3	92,0	331
109	291	14,2	4,9	112,0	386
124	294	15,0	5,1	116,5	397

der Kulturdauer ab (Spalte 4). Der absolute Nicotinsäure-Gehalt einer Kulturschale (Spalte 5) nimmt mit fortschreitender Kulturdauer zu und beträgt nach 124 h 116,5 µg (E n d o m y c o p s i s 58,7 µg nach 114 h). Anders als bei E n d o m y c o p s i s steigt jedoch der auf die Gewichtseinheit bezogene Nicotinsäure-Gehalt (Spalte 6) mit dem Alter der Kultur an:

236 µg nach 48 h und 397 µg nach 124 h Kulturdauer. - Die weiter oben angeführten Befunde anderer Untersucher zeigen, daß bei Verwendung verschiedener T o r u l o p s i s -Stämme und unterschiedlicher Kulturbedingungen der Nicotinsäure-Gehalt in der Trockensubstanz wesentlich höher sein kann.

2. Der Einfluß der N-Konzentration in der Nährlösung auf die Nicotinsäure-Bildung in Oberflächenkulturen von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p s i s u t i l i s

Bei E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s , die auf 1% Asparagin als alleiniger N-Quelle in der Nährlösung gezogen wurde, liegt eine Parallelität zwischen der N-Assimilation und der Nicotinsäure-Synthese vor (siehe Tab.5). T o r u l o p s i s u t i l i s hingegen bildet noch erhebliche Mengen Nicotinsäure bei sich erschöpfendem Nährsubstrat (siehe Tab.6). Auf 1 g Trockensubstanz bezogen nimmt mit steigender Kulturdauer bei E n d o m y c o p s i s der Nicotinsäure-Gehalt ab, bei T o r u l o p s i s hingegen erfolgt trotz Verminderung der N-Konzentration der Nährlösung eine stetige Zunahme. Um die Beziehungen zwischen der N-Konzentration in einer Nährlösung und dem Nicotinsäure-Bildungsvermögen beider Pilze näher kennenzulernen, sollte mit den folgenden Versuchsreihen der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt von N-Mangel-Kulturen[4]) untersucht werden.

Versuchsanordnung: Die Organismen wurden als Oberflächen-Kulturen auf Wöltje-Nährlösung mit vermindertem Asparagin-Gehalt gezogen. Für die E n d o m y c o p s i s -Kultur enthielt die

[4]) Während E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s auf 1/4% Asparagin-N in der Nährlösung ein noch ausreichendes Wachstum zeigt (S. HEIDE, 1939; H. KATING, 1955b), vermag sich T o r u l o p s i s u t i l i s bei dieser N-Konzentration kaum noch zu entwickeln. Für letzten Organismus sind o,5% Asparagin in der Wöltje-Nährlösung bereits N-Mangelbedingungen (H. RAAF, 1941

Wöltje-Lösung o,25% Asparagin und für die T o r u l o p s i s -Kultur o,5% dieser N-Quelle. Die Pilze wurden zu den in Abb.7 und 8 angegebenen Zeiten geerntet und wie bereits beschrieben aufgearbeitet.

Die Analysenergebnisse der E n d o m y c o p s i s -Kultur (o,25% Asparagin in der Nährlösung) sind in Abb.5 graphisch dargestellt worden. Zum Vergleich sind die Werte der N-reich angezogenen Kulturen (nach Tab.5) eingezeichnet worden. Die Trockensubstanz-Produktion in der N-Mangel-Kultur ist während der Kulturdauer gegenüber der Kontroll-Kultur um etwa ein Drittel verringert[5]. - Der Gesamt-N der Trockensubstanz einer Schale wurde bei der N-Mangel-Kultur mit 3,2 mg nach 63 h und 4,6 mg nach 129 h Kulturdauer ermittelt.

Der Nicotinsäure-Gehalt des Mycels ist für jeden Erntezeitpunkt in µg pro 1 g Trockensubstanz (= p.p.m.) angegeben worden. Während der Kulturdauer ist der Nicotinsäure-Gehalt im Mycel der N-armen Kulturen um etwa die Hälfte geringer als derjenige in der Kontrollkultur: In der N-Mangel-Kultur haben die jungen (63 h) Kulturen den höchsten Nicotinsäure-Gehalt; bei Kulturabbruch (129 h) sind nur 79 µg Nicotinsäure pro 1 g Trockensubstanz vorhanden.

Die Ergebnisse der Gesamt-Nicotinsäure-Bestimmung und der Trokkensubstanz-Produktion einer unter N-Mangel-Bedingungen (o,5% Asparagin) gezogenen T o r u l o p s i s -Kultur sind in Abb.6 zusammen mit den entsprechenden Werten aus der N-reichen Kultur (nach Tab.6) wiedergegeben worden. Die N-Konzentration in der Nährlösung bestimmt bei T o r u l o p s i s offensichtlich

[5] Die sogenannte Fetthefe E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s weicht bei geringem Stickstoff-Angebot in der Nährlösung auf eine gesteigerte Fettsynthese aus (siehe hierzu die Untersuchungen von S. HEIDE, 1939 und M. STEINER, H. KATING und U. JENDRALSKI, 1958).

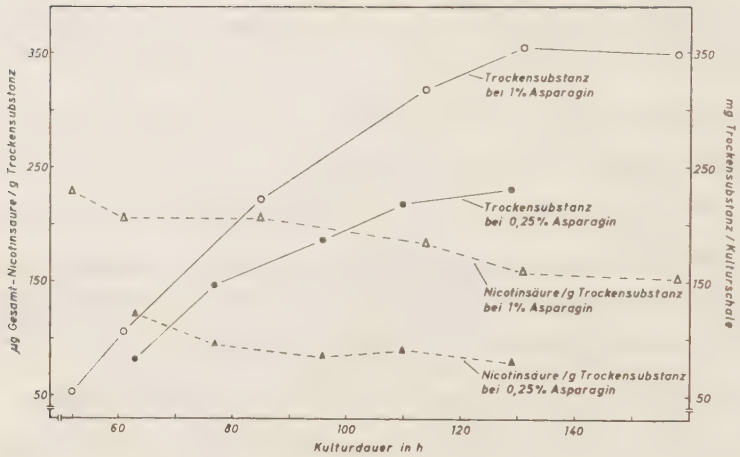


Abbildung 5: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : Trok=kensubstanzbildung und Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt (berechnet als µg pro 1 g Trockensubstanz) in Abhängigkeit von der Kultur=dauer und der Stickstoffkonzentration in der Wöltje-Nährlösung.
a) mit 1% Asparagin: ○——○ und △---△
b) mit o,25% Asparagin: ●——● und ▲---▲

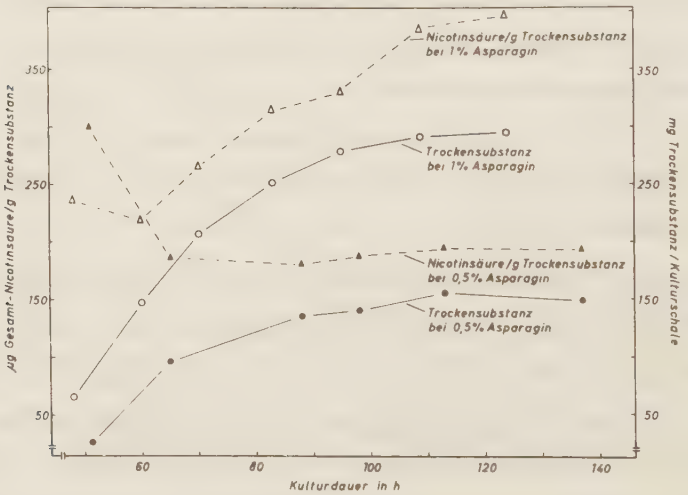


Abbildung 6: T o r u l o p s i s u t i l i s : Trockensub=stanzbildung und Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt (berechnet als µg pro 1 g Trockensubstanz) in Abhängigkeit von der Kulturdauer und der Stickstoffkonzentration in der Wöltje-Nährlösung.
a) mit 1% Asparagin: ○——○ und △---△
b) mit o,5% Asparagin: ●——● und ▲---▲

die Trockensubstanz-Bildung, denn gegenüber der mit 1% Aspa= ragin gewachsenen Kultur bringt die auf o,5% gezogene etwa das halbe Mycelgewicht. Anders als E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s kann nämlich die sogenannte Eiweißhefe T o = r u l o p s i s u t i l i s bei einer Verringerung des Stickstoff/Kohlenhydrat-Verhältnisses nicht auf eine wesent= lich gesteigerte Fettsynthese hin ausweichen (siehe Abb.5, wo= nach die Trockensubstanz-Bildung bei E n d o m y c o p s i s nicht eine Funktion des N-Gehaltes der Nährlösung ist).

Der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt des Mycels von T o r u l o p = s i s zu den angegebenen Erntezeitpunkten ist wiederum auf µg pro 1 g Trockensubstanz umgerechnet worden. Die N-reich und N-arm gezogenen Kulturen haben einen gegensätzlichen Verlauf der Kurven für den Nicotinsäure-Gehalt (Abb.6). Junge, N-arm gezogene T o r u l o p s i s -Kulturen haben mit 3o1 µg den höchsten Nicotinsäure-Gehalt, der aber rasch auf 188 µg (65 h) abfällt und sich dann während des weiteren Verlaufs der Kultur praktisch nicht mehr ändert. Die N-reich gezogene T o r u = l o p s i s -Kultur zeigt hingegen von 65 h an einen steti= gen Anstieg des Nicotinsäure-Gehaltes (397 µg/g Trockensub= stanz bei Versuchsabbruch).

Nach den in Abb.5 und 6 wiedergegebenen Nicotinsäure-Gehalts= kurven (berechnet als µg/g Trockensubstanz) der N-reich und N-arm gezogenen Kulturen kommt ein Unterschied zwischen der "Fetthefe" E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und der "Eiweißhefe" T o r u l o p s i s u t i l i s deutlich zum Ausdruck. Während im E n d o m y c o p s i s -Mycel unter beiden Aufwuchs-Bedingungen die Gesamt-Nicotinsäure mit stei=

gender Kulturdauer stetig abnimmt, steigt sie bei der N-reich gezogenen T o r u l o p s i s -Kultur bis zum Versuchsabbruch fortlaufend an. Da die Nicotinsäure praktisch vollständig als in NAD und NADP gebunden in der Zelle vorliegt, geht daraus hervor, daß bei N-normaler Aufzucht der Spiegel der Pyridinnucleotide in den älteren T o r u l o p s i s -Kulturen größer ist als in den jungen, während bei E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s es umgekehrt ist. - Zu klären bleibt noch in weiteren Versuchen, weshalb in der N-arm aufgezogenen T o r u l o p s i s -Kultur der Nicotinsäure-Gehalt nicht in gleicher Weise wie bei den N-reich kultivierten Zellen ansteigt, sondern sich über den gesammten Kulturverlauf hinweg (Ausnahme: junge Kultur!) auf der gleichen Höhe hält. Da die Stickstoffbilanz zeigt, daß in beiden Kulturreihen bei Versuchsabbruch noch assimilierbarer Stickstoff (und auch Kohlenhydrat) in der Nährlösung vorhanden ist, müßte nach den das Wachstum und die Nicotinsäure-Synthese begrenzenden Faktoren gesucht werden.

3. Auftreten von Nicotinsäure-Derivaten in den Restnährlösungen von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p s i s u t i l i s

Von einer Reihe von auxo-autotrophen Mikroorganismen wird berichtet, daß sie im Verlauf einer Kultur mehr oder weniger stark neben anderen Vitaminen auch Nicotinsäure in das Nährmedium abgeben (siehe z.B. H. HAENEL u. W. MÜLLER-BEUTHOW, 1956; G. PANTOS, 1961; R. KARLIN, 1963; A.H. ROSE, 1960; V.M. BLAGODATSKAYA u. E.N. ODINTSOVA, 1967). Der nach etwa 5 Tagen einsetzende Abfall des absoluten Gesamt-Nicotinsäure-Gehaltes im Mycel von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s führt zu

der Annahme, daß entweder von diesem Zeitpunkt an bei diesem Organismus ein Abbauprozeß die Biosynthese überwiegt, oder daß Nicotinsäure beziehungsweise ihre Derivate in das Kulturmedium ausgeschieden werden. Aus diesem Grunde sollte auch das Nährsubstrat der beiden Hefen auf ausgeschiedene Nicotinsäure-Derivate (bestimmt als Gesamt-Nicotinsäure) analysiert werden.

Zu diesem Zweck wurden die Restnährlösungen (Wöltje-Lösung) und die Waschflüssigkeit von jeweils sechs Kulturen zu den in Tab.7 und 8 angegebenen Zeiten gesammelt. Der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt der Restnährlösungen (Ansatz N-reich mit 1% Aspa-

Tabelle 7: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : Der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt der Restnährlösung in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Mittelwerte aus sechs Parallelkulturen.

Kultur-dauer h	Trocken-substanz mg	Gesamt-Nicotinsäure µg	pH-Wert d. Restnähr-lösung
58	99	3,8	4,o
72	164	4,9	4,8
82	195	5,2	5,1
96	238	9,5	5,3
126	338	2o,1	6,2

Tabelle 8: T o r u l o p s i s u t i l i s : Der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt der Restnährlösung in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Mittelwerte aus sechs Parallelkulturen.

Kultur-dauer h	Trocken-substanz mg	Gesamt-Nicotinsäure µg	pH-Wert d. Restnähr-lösung
48	67	1,2	4,1
72	2o4	2,6	4,3
95	246	2,5	4,9
12o	281	2,8	5,5
144	26o	3,4	6,1

ragin) wurde nach der auf S.15 angegebenen Methode bestimmt.

Bereits nach 58 h Kulturdauer sind in der Restnährlösung einer Schale von *Endomycopsis vernalis* (Tab.7) 3,8 µg Gesamt-Nicotinsäure nachweisbar. Dieser Wert erhöht sich bei den folgenden Ernten (72 bzw. 82 h Kulturdauer) nur unwesentlich, steigt aber mit Erschöpfung des Nährsubstrates (96 und 126 h Kulturdauer) plötzlich stark an. Eine mikroskopische Kontrolle der *Endomycopsis*-Zellen ergab, daß zu diesem Zeitpunkt die Autolyseerscheinungen stark zunehmen. Es ist wahrscheinlich, daß die Autolyse von Zellen infolge Nährstoffmangels der Grund für das verstärkte Auftreten von Nicotinsäure im Nährmedium der älteren Kulturen ist. - Die weiter oben aufgeführten Befunde über eine "Exkretion" von Nicotinsäure in die Nährlösung verschiedener anderer Mikroorganismen-Kulturen müßten dahingehend überprüft werden, ob nicht auch für diese Fälle Autolysevorgänge verantwortlich sind.

J.C. LEWIS (1944) berichtete, daß *Torulopsis utilis* in einer Schüttelkultur mit vollsynthetischer Nährlösung bis zu 1,22 µg Nicotinsäure in 1 ml Medium exkretiert. Weiterhin berichtete J.M. von LANEN (1947), daß verschiedene *Torulopsis*-Stämme aus einem halbsynthetischen Medium, dem verschiedene Nicotinsäure-Konzentrationen zugesetzt worden waren (4,7 µg und 14,7 µg/ml), beträchtliche Mengen des gebotenen Vitamins zu absorbieren vermögen. Demnach scheint *Torulopsis* dies Vitamin sowohl ausscheiden als auch assimilieren zu können.

Die in Tab.8 wiedergegebenen Analysenergebnisse zeigen, daß,

obwohl T o r u l o p s i s u t i l i s bedeutend höhere Konzentrationen an Nicotinsäure als E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s im Mycel hat, nur sehr geringe Mengen des Vitamins im Medium nachweisbar sind (3,4 µg bei Versuchsabbruch). Die Tatsache, daß von 12o auf 144 h Kulturdauer das Trockengewicht von 281 auf 26o mg pro Kulturschale abgenommen hat, läßt vermuten, daß der Anstieg von 2,8 auf 3,4 µg Nicotinsäure in der Restnährlösung auf Autolyseerscheinungen zurückzuführen ist. Es besteht aber keine Parallelität zwischen Abnahme der Trockensubstanz (21 mg) und einem gesteigerten Auftreten der Nicotinsäure im Nährmedium (o,6 µg) in diesem Zeitraum von 24 h. Es hätten bei dieser Trockensubstanzverminderung nach der Nicotinsäure-Konzentration im Mycel (siehe Tab.6; ca. 39o µg) etwa 25 µg im Kulturmedium auftreten müssen. Offensichtlich wird der größte Teil der im Medium freigesetzten Nicotinsäure-Verbindung von den Zellen wieder assimiliert. - Auch bei T o r u l o p s i s -Kulturen sprechen die Analysen im Zusammenhang mit der mikroskopischen Kontrolle dafür, daß mit zunehmendem Alter der Kultur Autolyseerscheinungen verstärkt einsetzen. - Eine dünnschicht- und papierchromatographische Analyse der eingeengten Restnährlösung brachte keine Hinweise dafür, daß freie Nicotinsäure beziehungsweise freies Nicotinsäureamid auftreten.

III. DIE NICOTINSÄURE-BILDUNG BEI E N D O M Y C O P S I S V E R N A L I S UND T O R U L O P S I S U T I L I S IN ABHÄNGIGKEIT VON DER N-QUELLE.

Die im vorstehenden Abschnitt wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, daß der Gehalt der Nicotinsäure in beiden Versuchsorganismen unterschiedlich von der Asparagin-Konzentration im Medium beeinflußt wird. Mit den folgenden Versuchen sollte geprüft werden, in welcher Weise sich andere - als jeweils alleinige N-Quelle gebotene - Aminosäuren auf die Nicotinsäure-Synthese auswirken. Die Untersuchungen wurden mit sogenannten Umpflanzkulturen durchgeführt, wobei nach Vorzucht auf Asparagin die Pilzdecken auf neuen Nährlösungen mit verschiedenen N-Quellen weiterkultiviert wurden. Als N-Quellen wurden u.a. auch solche Verbindungen eingesetzt, die als Vorstufen bei der Nicotinsäure-Synthese einiger Organismen in der Literatur diskutiert worden sind (H. KNOBLOCH, 1955; E.F. MÖLLER, 1961).

1. Wachstum, N-Assimilation und Nicotinsäure-Bildung der Umpflanzkulturen von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s auf Glutamin, Ornithin, Lysin und Tryptophan

Versuchsanordnung: E n d o m y c o p s i s wurde unter N-Mangelbedingungen (o,25% Asparagin in der Wöltje-Nährlösung) 4 Tage lang vorgezogen und dann auf Wöltje-Lösungen umgepflanzt, die bei den folgenden Versuchen die jeweilig angegebenen N-Quellen (N-äquivalent zu 1% Asparagin) enthielten. Als Kontrolle dienten Parallelkulturen auf 1% - bzw. o,5 oder o,25% - Asparagin. Die Ernte erfolgte zu den in den Abbildungen angegebenen Zeiten nach der Umpflanzung. - Die Analysenwerte zum Zeitpunkt der Umpflanzung wurden gleich 1oo% gesetzt; die Zunahme der Trockensubstanz, des Gesamt-N und der Gesamt-Nicotinsäure nach Kultur auf der neuen Nährlösung sind prozentual zu diesen Ausgangswerten angegeben worden.

a) L-Glutamin (Abb.7): H. KATING (1955a) berichtete, daß E n d o m y c o p s i s u.a. auch auf Glutamin sehr gut zu wachsen

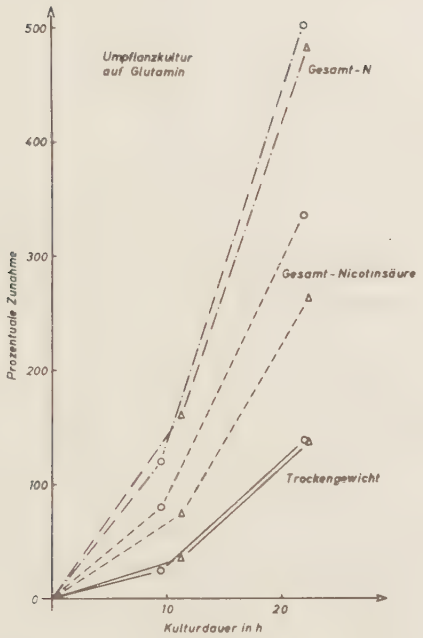


Abbildung 7: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : N-arme Vorzucht; danach Umpflanzkulturen auf Wöltje-Nährlösung mit den N-Quellen a) 1% Asparagin und b) Glutamin (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung (= 0 h) angegeben. Mittel= werte aus je drei Kulturschalen.
Versuchsreihe a: o——o = Trockensubstanz; o—·—o = Gesamt-N; o- - -o = Gesamt-Nicotinsäure. Versuchsreihe b: Δ——Δ = Trocken= substanz; Δ—·—Δ = Gesamt-N; Δ- - -Δ = Gesamt-Nicotinsäure.

vermag. Im Vergleich mit der auf 1% Asparagin gezogenen Kultur zeigt sich dann auch, daß praktisch kein Unterschied im Wachs= tum und der N-Aufnahme des Pilzes besteht. Ein geringer Unter= schied ist lediglich im Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt der beiden Parallelkulturen festzustellen. Es fällt auf, daß vom Zeitpunkt der Umpflanzung an die prozentuale Zunahme der Gesamt-N und

der Gesamt-Nicotinsäure wesentlich größer ist als die Trocken=substanzproduktion (nach 22 h Kulturdauer ca. 5oo%, 3oo% und 14o% in der Reihenfolge). Die starke N-Assimilation ist ohne Zweifel auf die nach der N-armen Vorzucht (= Verfettung von E n d o m y c o p s i s ; siehe S.4o) bevorzugt einsetzende Eiweißbildung zurückzuführen. Gleichzeitig ist auch eine be=deutende Nicotinsäure-Synthese festzustellen. Dies ist ein Hin=weis darauf, daß die Enzyme, die Nicotinsäure als Baustein ha=ben, vornehmlich bei dem verstärkten N-Stoffwechsel syntheti=siert werden. Das stimmt mit dem auf S.37 wiedergegebenen Be=fund überein, daß bei der Eiweißhefe, die nicht "verfettet" werden kann, der Nicotinsäure-Spiegel mit fortschreitender Kul=turdauer stetig steigt, während bei der sogenannten Fetthefe E n d o m y c o p s i s (falls nicht wie nach Abb.7 nach N-Man=gel-Aufzucht eine Eiweißsynthese nachgeholt werden muß) mit zu=nehmendem Alter der Kultur die Gesamt-Nicotinsäure prozentual abnimmt (siehe Abb.5).

b) L-Ornithin: T.S. WORK u. E. WORK (1948) diskutierten für E s c h e r i c h i a c o l i einen Biosyntheseweg, der vom Ornithin ausgeht und u.a. über 2-Hydroxy-5-aminovaleriansäure und Guvacin zur Nicotinsäure führt (siehe auch H. KNOBLOCH, 1955). - Wie die in Abb.8 dargestellten Ergebnisse - wiederum ausgedrückt in prozentualer Zunahme der jeweiligen Werte einer Schale nach der Umpflanzung - der Trockensubstanz-Bildung, des Gesamt-N- und Gesamt-Nicotinsäure-Gehaltes einer auf Ornithin (N-äquivalent zu 1% Asparagin) umgepflanzten Kultur zeigen, kann E n d o m y c o p s i s diese Aminosäure weniger gut als Asparagin nutzen (vgl. H. KATING, 1959; L. ECKERT u. H. KATING,

Abbildung 8: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : N-arme Vorzucht; danach Umpflanzkulturen auf Wöltje-Nährlösung mit den N-Quellen a) 1% Asparagin und b) Ornithin (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegen= über den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung (= 0 h) angegeben. Mittelwerte aus je drei Kulturschalen.
Versuchsreihe a: o——o = Trockensubstanz; o—·—o = Gesamt-N; o- - -o = Gesamt-Nicotinsäure. Versuchsreihe b: Δ——Δ = Trocken= substanz; Δ—·—Δ = Gesamt-N; Δ- - -Δ = Gesamt-Nicotinsäure.

1968). Der N-Gehalt der Ornithinkultur bleibt mit 1o,2 mg (nach 11 h Kulturdauer) und 15,2 mg (nach 24 h) deutlich unter den entsprechenden Werten von 11,2 mg (1o h) und 22,1 mg (23 1/2 h) der Asparagin-Kultur. Eine wesentlich größere Differenz zeigen beide Kulturen jedoch in der Nicotinsäure-Produktion. Von 15,3 µg (= 83,2 p.p.m.; 0 h) erhöht sich der Gesamt-Nicotinsäure-Ge= halt in der Ornithin-Kultur nach 11 h auf 27,2 µg (= 11o,4 p.p.m.) und nach 24 h auf 32,9 µg (= 93,2 p.p.m.), während der Gehalt der Vergleichskultur mit 3o,9 µg (= 117,5 p.p.m., nach 1o h) und

7o,3 µg (= 17o,o p.p.m., nach 23 1/2 h) wesentlich stärker zu=nimmt. - Auch hierin kommt, wie im vorhergehenden Versuch, die Verminderung der Nicotinsäure-Synthese bei verringerter Eiweiß=bildung zum Ausdruck. Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen sind keine Anzeichen für eine Nicotinsäure-Synthese aus Ornithin als Vorstufe vorhanden.

c) L-Lysin: Auf L-Lysin als alleiniger N-Quelle vermag E n = d o m y c o p s i s v e r n a l i s nur geringfügig zu wach=sen (H. KATING, 1955a). Es sollte jedoch geprüft werden, ob in solchen, praktisch als ruhend zu bezeichnenden E n d o m y = c o p s i s -Kulturen Lysin als Substrat für die Nicotinsäure-Synthese dienen kann, wobei die Pyridinderivat-Bildung durch Ringschluß des Lysins (ähnlich der Bildung der Piperidin-Alka=loide usw.; siehe E. RAMSTAD u. S. AGURELL, 1964) erfolgt[6]).

Für die Untersuchungen wurden 4 Tage alte N-Mangel-Kulturen (Vorzucht auf o,25% Asparagin) auf Lysin umgepflanzt, das we=gen der geringen Löslichkeit bei pH 4,5 nur N-äquivalent zu o,5% Asparagin berechnet worden war. Um das gleiche N:C-Verhält=nis zu wahren, wurden 3,75% Saccharose statt 7,5% in der Nähr=lösung geboten.

Die Ergebnisse sind in Abb.9 graphisch dargestellt worden. We=gen des N-Mangels ist die Trockengewichtszunahme in der Aspara=gin-Kultur geringer als in den beiden vorhergehenden Versuchs=reihen. Während der Unterschied in der Trockensubstanz-Zunahme in beiden Reihen (273 mg der Asparagin-Kultur nach 13 h; 261 mg der Lysin-Kultur nach 15 h) nicht sehr groß ist, zeigt sich jedoch in der N-Aufnahme der beiden Parallelkulturen eine gro=ße Differenz: Auf dem Asparagin-Medium steigt der Gesamt-N um

[6]) In diesem Zusammenhang sei darauf verwiesen, daß eine Bezie=hung zwischen Asparaginsäure und Lysin mit dem Lysin-Biosynthe=seweg gegeben ist: Asparaginsäure → Aspartyl-semialdehyd → α, ε-Diamino-pimelinsäure → Lysin.

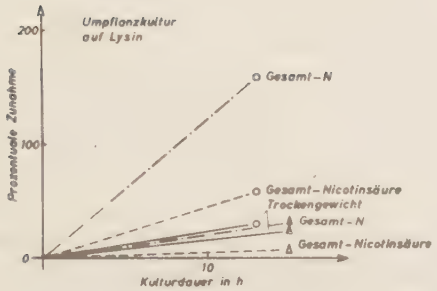


Abbildung 9: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : N-arme Vorzucht; danach Umpflanzkulturen auf Wöltje-Nährlösung mit den N-Quellen a) 0,5% Asparagin und b) Lysin (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung (= 0 h) angegeben. Mittelwerte aus je drei Kulturschalen.
Versuchsreihe a: o —— o = Trockensubstanz; o — · — o = Gesamt-N; o - - - o = Gesamt-Nicotinsäure. Versuchsreihe b: Δ —— Δ = Trockensubstanz; Δ — · — Δ = Gesamt-N; Δ - - - Δ = Gesamt-Nicotinsäure.

160%, auf Lysin als N-Quelle hingegen nur um 30%. E n d o m y c o p s i s kann also Lysin als N-Quelle nur sehr schlecht verwerten. Entsprechend gering ist auch die Nicotinsäure-Bildung in der Lysin-Kultur. Offensichtlich ist Lysin auch als Vorstufe für die Nicotinsäure-Biosynthese auszuschließen (siehe auch weiter unten S.55).

d) L-Tryptophan: Der über den Tryptophan-Abbau verlaufende Biosyntheseweg der Nicotinsäure ist sowohl für eine Reihe von Säugetieren als auch für einige Pilze nachgewiesen worden (C.W.H. PATRIDGE u. Mitarb., 1952; F. LINGENS u. P. VOLLPRECHT, 1964; Zus.fass. siehe H. KATING, 1968). Es sollte deshalb geprüft werden, ob eine deutliche Förderung der Nicotinsäure-Synthese durch Tryptophan als N-Quelle bei E n d o m y c o p s i s eintritt. Hierbei ist aber zu beachten, daß nach H. KATING

(1955a) dieser Organismus auf Tryptophan nur mäßig bis schlecht wächst. In Fortführung dieser Arbeiten konnten jedoch K.-W. GLOMBITZA u. T. HARTMANN (1966) nachweisen, daß Tryptophan durch E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s sehr rasch abgebaut wird über ß-(Indolyl-3-)brenztraubensäure u.a. zu ß-(Indolyl-3-)milchsäure, α-(Indolyl-3-)essigsäure und Indolyl-3-acetaldehyd (siehe auch K.-W. GLOMBITZA, 1965 und 1967).

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die Hefe 4 1/2 Tage lang N-arm (o,25% Asparagin in der Wöltje-Lösung) vorgezogen. Wegen der geringen Löslichkeit von L-Tryptophan wurden die Pilzdecken auf abgewandelte Wöltje-Nährlösungen umgepflanzt, die a) o,25% Asparagin und b) die äquivalente Menge L-Tryptophan enthielten. Die Kohlenhydratquelle wurde auf 3,75% reduziert (= 1/2 C-Quelle). Die Ernte erfolgte zu den in Abb.1o angegebenen Zeiten.

Wie aus Abb.1o zu ersehen ist, bleibt das Wachstum, die N-Aufnahme und Nicotinsäure-Bildung der auf Tryptophan umgepflanz-

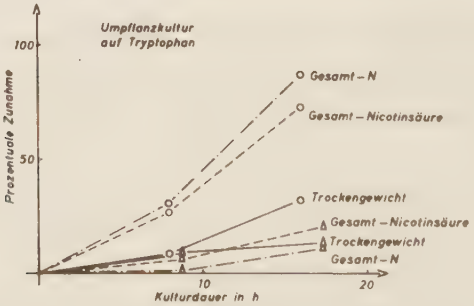


Abbildung 1o: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : N-arme Vorzucht; danach Umpflanzkulturen auf Wöltje-Nährlösung mit den N-Quellen a) o,25% Asparagin und b) Tryptophan (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung (= 0 h) angegeben. Mittelwerte aus je drei Kulturschalen. Versuchsreihe a: o——o = Trockensubstanz; o—·—o = Gesamt-N; o- - -o = Gesamt-Nicotinsäure. Versuchsreihe b: Δ——Δ = Trockensubstanz; Δ—·—Δ = Gesamt-N; Δ- - -Δ = Gesamt-Nicotinsäure.

ten Kultur stark hinter dem der entsprechenden Asparagin-Kultur zurück. Während aber in der Asparagin-Kultur und bei allen

anderen geprüften N-Quellen der prozentuale Anstieg des Ge=samt-N immer höher war als der der Gesamt-Nicotinsäure (vgl. auch Abb.7 bis 9), hat in der Tryptophan-Kultur umgekehrt der Nicotinsäure-Gehalt mit 21% (gegenüber 13%) den größten An=stieg zu verzeichnen. Hierin wird angedeutet, daß Tryptophan als Substrat für die Nicotinsäure-Bildung bei E n d o m y = c o p s i s dient.

2. Wachstum, N-Assimilation und Nicotinsäure-Bildung der Um=pflanzkulturen von T o r u l o p s i s u t i l i s auf Ornithin, Lysin, Tryptophan, Asparaginsäure und Ammonium=phosphat

In gleicher Weise wie bei E n d o m y c o p s i s v e r n a= l i s sollte auch bei T o r u l o p s i s u t i l i s der Einfluß einiger anderer N-Quellen im Vergleich zum Asparagin-Medium) auf die Nicotinsäure-Synthese geprüft werden.

a) L-Ornithin: T o r u l o p s i s wurde N-arm (o,25% Aspa=ragin) 3 1/2 Tage lang vorgezogen und dann auf ein Wöltje-Me=dium umgepflanzt, das a) 1% Asparagin und b) N-äquivalent zu a L-Ornithin als N-Quelle enthielt. Die Ernten wurden nach 0; 7 und 14 h Kulturdauer durchgeführt.

Der Befund von L. ECKERT (1968), daß das Wachstum der Umpflanz=kulturen von T o r u l o p s i s u t i l i s auf Ornithin um etwa 5o% gegenüber den auf Asparagin gezogenen vermindert ist, wird durch die vorliegenden Analysen bestätigt (Abb.11). Entsprechend ist auch die N-Assimilation in den Ornithin-Kul=turen vermindert: ca. 41o% Zunahme bei der Asparagin-Kultur und etwa 25o% bei der Ornithin-Kultur bei Versuchsabbruch. - Die Nicotinsäure-Synthese ist allerdings in der Ornithin-Kul=tur auffallend stark gehemmt. Bei Versuchsabbruch beträgt der Anstieg in der Asparagin-Kultur 247%, in der Ornithin-Kultur hingegen nur 87%. Damit wird auch für T o r u l o p s i s

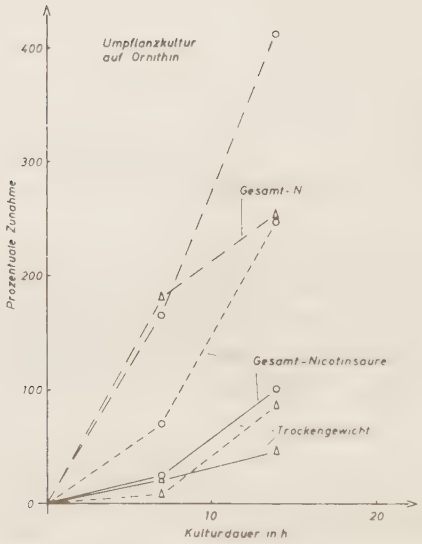


Abbildung 11: T o r u l o p s i s u t i l i s : N-arme Vorzucht; danach Umpflanzkulturen auf Wöltje-Nährlösung mit den N-Quellen a) 1% Asparagin und b) Ornithin (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung (= 0 h) angegeben. Mittelwerte aus je drei Kulturschalen.
Versuchsreihe a: o——o = Trockensubstanz; o—·—o = Gesamt-N; o---o = Gesamt-Nicotinsäure. Versuchsreihe b: Δ——Δ = Trockensubstanz; Δ—·—Δ = Gesamt-N; Δ---Δ = Gesamt-Nicotinsäure.

u t i l i s eine Nicotinsäure-Bildung nach dem von T.S. WORK u. E. WORK (1948) diskutierten Biosyntheseweg vom Ornithin aus fraglich.

b) L-Lysin: Eine 4 Tage lang N-arm (0,25% Asparagin) vorgezogene T o r u l o p s i s -Kultur wurde auf eine abgewandelte Wöltje-Lösung umgepflanzt, die a) Asparagin und b) L-Lysin (dem Asparagin-N äquivalent) als N-Verbindungen enthielt. Wegen der geringen Löslichkeit von Lysin beim pH-Wert 4,5 wurden beide Substanzen auf die Konzentration von 0,5% berechnet (vgl. S. 50). Als C-Quelle wurden 3,75% Zucker gegeben.

T o r u l o p s i s u t i l i s kann L-Lysin (Abb.12) wesentlich besser nutzen als E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s

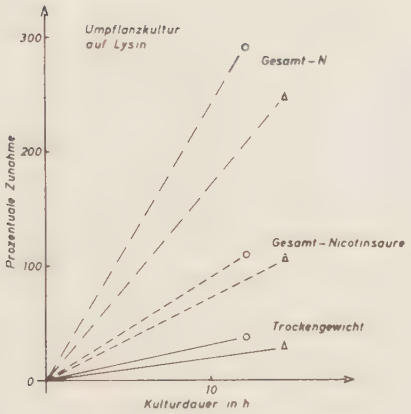


Abbildung 12: T o r u l o p s i s u t i l i s : N-arme Vorzucht; danach Umpflanzkulturen auf Wöltje-Nährlösung mit den N-Quellen a) o,5% Asparagin und b) Lysin (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung (= 0 h) angegeben. Mittelwerte aus je drei Kulturschalen.
Versuchsreihe a: o——o = Trockensubstanz; o—·—o = Gesamt-N; o– – –o = Gesamt-Nicotinsäure. Versuchsreihe b: Δ——Δ = Trockensubstanz; Δ—·—Δ = Gesamt-N; Δ– – –Δ = Gesamt-Nicotinsäure.

Der N-Gehalt der auf Lysin gezogenen E n d o m y c o p s i s - Kultur erhöht sich nach 15 h nur um 3o% (siehe Abb.9), aber bei T o r u l o p s i s um 247%. L-Lysin ist unter diesen Kulturbedingungen für T o r u l o p s i s u t i l i s eine gute N-Quelle. Es wird hinsichtlich der Trockensubstanz-Produktion, des Gesamt-N-Gehaltes und der Nicotinsäure-Bildung fast gleich gut verwertet wie Asparagin.

c) L-Tryptophan: Eine 3 Tage lang auf o,25% Asparagin auf Wöltje-Lösung vorgezogene T o r u l o p s i s -Kultur wurde auf ein Medium umgepflanzt, das a) o,5% Asparagin und b) die N-äquivalente Menge L-Tryptophan enthielt, wobei das Tryptophan nur zum Teil in der Nährlösung gelöst vorlag. Die C-Quelle wurde wiederum um die Hälfte vermindert.

K.-W. GLOMBITZKA u. T. HARTMANN (1966) berichteten u.a., daß bei

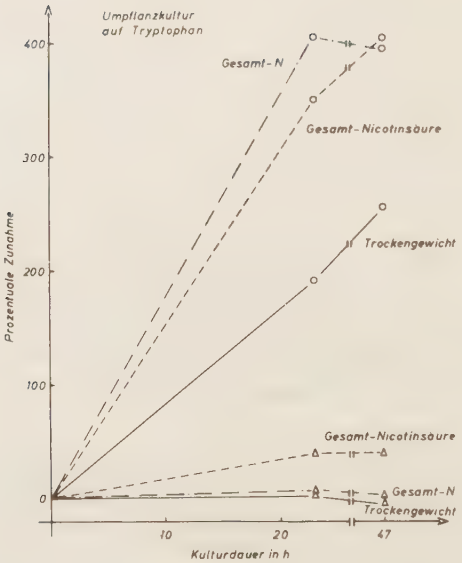


Abbildung 13: T o r u l o p s i s u t i l i s : N-arme Vorzucht; danach Umpflanzkulturen auf Wöltje-Nährlösung mit den N-Quellen a) o,5% Asparagin und b) Tryptophan (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung (= o h) angegeben. Mittelwerte aus je drei Kulturschalen.
Versuchsreihe a: o——o = Trockensubstanz; o—·—o = Gesamt-N; o- - -o = Gesamt-Nicotinsäure. Versuchsreihe b: Δ——Δ = Trockensubstanz; Δ—·—Δ = Gesamt-N; Δ- - -Δ = Gesamt-Nicotinsäure.

Umpflanzkulturen von T o r u l o p s i s u t i l i s auf Tryptophan die Anzahl der durch den Abbau dieser Aminosäure im Kulturfiltrat anfallenden Spaltprodukte wesentlich größer ist als bei E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s . Die in Abb. 13 dargestellten Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß T o r u l o p s i s auf Tryptophan als N-Quelle nicht wächst. Das Trockengewicht wird während des Kulturverlaufes gar nicht und die N-Aufnahme nur sehr geringfügig erhöht.

Es muß demnach angenommen werden, daß T o r u l o p s i s zwar ein Abbausystem für Tryptophan besitzt, jedoch diese Aminosäure und deren Abbauprodukte nicht oder nur in sehr geringem Maße in den Stoffwechsel einzubeziehen vermag. Andererseits ist aber ein deutlicher Anstieg des Nicotinsäure-Gehaltes im Verlaufe der Kulturdauer um etwa 4o% zu verzeichnen. Im Vergleich zur Asparagin-Kultur ist diese Zunahme gering. Die Zunahme des Nicotinsäure-Gehaltes bei der nich wachsenden, also "ruhenden Kultur" zeigt aber, daß Tryptophan wahrscheinlich auch für T o r u l o p s i s , wie für viele andere Organismen, Substrat für die Nicotinsäure-Synthese (beziehungsweise des in NAD gebundenen Nicotinsäureamids) ist.

d) Asparaginsäure und Ammonium-hydrogenphosphat: T o r u l o p s i s u t i l i s zeigt auf Ammoniumionen als einziger N-Quelle in der Nährlösung gleich starkes Wachstum wie auf Asparagin, wächst aber bei N-äquivalenter Asparaginsäure-Gabe nur halb so gut (L. ECKERT u. H. KATING, 1968; siehe auch M. STEINER u. H. KATING, 1961). Andererseits wird aber das Asparaginsäure-Molekühl (zusammen mit einem C_3-Körper) als Baustein in einem der Nicotinsäure-Biosynthesewege angesehen (M.V. ORTEGA u. G.M. BROWN, 196o; siehe Abb.1). Es schien deshalb von Interesse zu prüfen, ob Asparaginsäure mit den aus dem Zuckerabbau zur Verfügung gestellten C_3-Verbindungen eine erhöhte Nicotinsäure-Synthese bewirkt.

Versuchsansatz: Es wurden 4 Tage alte N-arm gezogene T o r u l o p s i s -Kulturen (o,5% Asparagin) auf neue Nährlösungen umgepflanzt, die a) o,5% Asparagin, b) Asparaginsäure (N-äquivalent zu a) und c) Ammonium-hydrogenphosphat und Fumarsäure (N- und C-äquivalent zu a) enthielten.

Die weiter oben angeführten Befunde über das Wachstum von T o r u l o p s i s -Umpflanzkulturen auf diesen N-Verbin= dungen werden durch die Versuchsansätze bestätigt: Das Pilz= trockengewicht (nicht in Abb.14 eingetragen) einer Schale steigt in der Asparagin-Kultur nach 16 h von 167 mg (Zeitpunkt 0) auf 24o mg, das der Ammoniumsalz-Kultur auf 256 mg (nach 18 h) und in der Asparaginsäure-Kultur nur auf 2o6 mg (nach 16 h) an. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für die N-Assi= milation und die Nicotinsäure-Synthese durch die drei Parallel= kulturen (Abb.14): Die höchsten prozentualen Zunahmen erfolgen

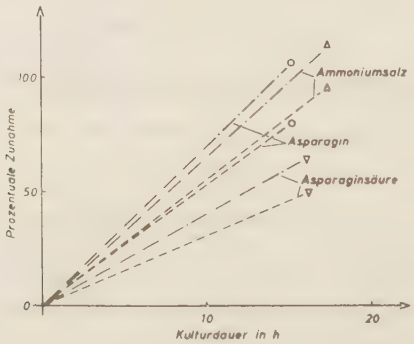


Abbildung 14: T o r u l o p s i s u t i l i s : N-arme Vor= zucht; danach Umpflanzkulturen auf Wöltje-Nährlösung mit den N-Quellen a) o,5% Asparagin, b) Asparaginsäure (N-äquivalent zu a) und c) Ammonium-hydrogenphosphat + Fumarsäure (N- und C-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zu= nahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung (= 0 h) angegeben. Mittelwerte aus je drei Kulturschalen.
Versuchsreihe a: o—·—o Gesamt-N; o– – –o = Gesamt-Nicotinsäure.
Versuchsreihe b: Δ—·—Δ Gesamt-N; Δ– – –Δ = Gesamt-Nicotinsäure.
Versuchsreihe c: ▽—·—▽ Gesamt-N; ▽– – –▽ = Gesamt-Nicotinsäure.

für den Gesamt-N und die Gesamt-Nicotinsäure wiederum beim Wachs= tum auf Asparagin; auf Asparaginsäure ist die geringste Zunah= me zu verzeichnen. - Die Versuche zeigen erneut, daß bei T o =

r u l o p s i s die Nicotinsäure-Synthese in enger Verbin= dung mit der Zunahme des Gesamt-N-Gehaltes erfolgt.

Diese Ergebnisse lassen noch eine weitere Aussage zu: Die N-haltigen Verbindungen in den Nährlösungen waren für alle drei Parallelkulturen N-äquivalent (0,5% Asparagin) geboten worden, so daß in der Asparaginsäure-Kultur die Aminosäure in doppelt hoher molekularer Konzentration vorlag als in der Asparagin-Kultur. Wenn nun das C_4-Gerüst des Asparagins oder der Aspara= ginsäure als Baustein bei der Nicotinsäure-Synthese über den Asparaginsäure-C_3-Biosyntheseweg bei T o r u l o p s i s Be= deutung haben sollte, hätte ein höherer Nicotinsäure-Gehalt oder zumindest ein gleich hoher wie in der Asparagin-Kultur erwartet werden können. Er lag jedoch um 41% niedriger. - Zum anderen waren für den C-Ausgleich in der NH_4^+-Kultur (C-äquiva= lent der Asparagingabe) Fumarsäure zugesetzt worden. Als C_4-Verbindung (und der Asparaginsäure strukturell verwandte Sub= stanz) hätte eventuell auch die Fumarsäure die Nicotinsäure-Synthese stimulieren können. Dies war jedoch nicht der Fall, so daß es unter den vorliegenden Versuchsbedingungen unwahr= scheinlich ist, daß bei T o r u l o p s i s u t i l i s der verkürzte Biosyntheseweg der NAD-Bildung (siehe Abb.1, S.7) vorliegt. Es sei aber darauf hingewiesen, daß nach den Befun= den von H.-D. HEILMANN u. F. LINGENS (1968) der Asparaginsäure-Chinolinsäure-Weg zur Bildung des gebundenen Nicotinsäureamids bei S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e dann be= schritten wird, wenn die Bildung über den Tryptophan-Abbau (et= wa durch Anaerobie) gehemmt wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen mit Umpflanzkulturen von *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* lassen sich hinsichtlich der Nicotinsäure-Synthese folgendermaßen zusammenfassen: Die prozentuale Zunahme des Gesamt-Nicotinsäure-Gehaltes ist in allen Kulturen (ausgenommen die Lysin- und Tryptophan-Kulturen) nicht so stark wie die des N-Gehaltes aber stärker als der Trockensubstanz-Anstieg. Daraus kann gefolgert werden, daß ein Zusammenhang besteht zwischen der verstärkten Eiweißsynthese und der Bildung der als Baustein für bestimmte Enzymsysteme benötigten Nicotinsäure. - In den Tryptophan-Umpflanzkulturen beider Versuchsorganismen war die stärkste prozentuale Zunahme im Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt festgestellt worden. Dies läßt vermuten, daß die Nicotinsäure in beiden Organismen über den Tryptophan-Abbauweg synthetisiert wird.

IV. UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE DER NICOTINSÄURE IN ENDOMYCOPSIS VERNALIS UND TORULOPSIS UTILIS

Nach den zuvor beschriebenen Versuchen ist der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt der auf Asparagin gezogenen Kulturen von Endomycopsis und Torulopsis stets höher als derjenige der auf den anderen N-Verbindungen gewachsenen. Es liegt die Möglichkeit nahe, daß Asparagin nach Desamidierung eine Vorstufe in der Nicotinsäure-Synthese bei beiden Organismen ist (siehe u.a. Abb.1, Reaktionsschritt 15). Weiterhin zeigen aber die Umpflanzkulturen auf Tryptophan, daß sich in diesen trotz einer sehr geringen N-Assimilation und Trockensubstanz-Bildung der Nicotinsäure-Gehalt erhöht (siehe S. 52 und 55). Es sollte deshalb zunächst geprüft werden, ob beide Versuchsorganismen - wie es für andere Pilze nachgewiesen worden ist - Nicotinsäure über den Tryptophan-Abbauweg synthetisieren (siehe u.a. L.K. GEORG, 1949; D.M. BONNER u. E. WASSERMAN, 1950; F. LINGENS u. P. VOLLPRECHT, 1964).

1. Vorversuche

In Versuchsansätzen, in denen verschiedene Tryptophan-Konzentrationen (N-äquivalent zu 0,01 bis 0,4% Asparagin, vgl. Abb.10 und 13) zusammen mit Asparagin oder Lysin als N-Quelle geboten wurden, wurde bestätigt, daß Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis auch unter diesen Bedingungen Tryptophan als N-Quelle sehr schlecht zu nutzen vermögen. In allen Fällen zeigen aber beide Organismen nach Umpflanzung auf Tryptophan eine deutliche prozentuale Zunahme des Gesamt-Nicotinsäure-Gehaltes, und zwar bis zu 20% bei

E n d o m y c o p s i s und bis zu 4o% bei T o r u l o p = s i s . In weiteren Versuchsreihen sollte mit dem Angebot von Zwischenstufen des Tryptophan-Nicotinsäure-Metabolismus (siehe Abb.15) im Nährsubstrat der Nachweis der Nicotinsäure-Synthese auf diesem Wege geführt werden.

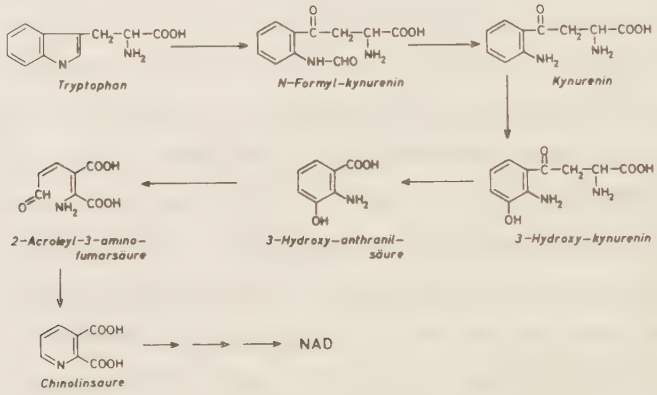


Abbildung 15: Schema des oxydativen Tryptophan-Abbaues zu Chi= nolinsäure (den weiteren Abbau siehe S.7).

In Vorversuchen mit Umpflanzkulturen, die auf o,1% DL-Kynurenin als alleiniger N-Quelle gezogen wurden, konnte trotz des sehr niedrigen N-Angebotes ein sprunghafter Anstieg des Nicotinsäu= re-Gehaltes nachgewiesen werden. Um den Einfluß der untersuch= ten Zwischenverbindungen besser nachweisen zu können, wurden die Versuche mit ruhenden Kulturen durchgeführt.

Versuchsanordnung: Die Versuchsorganismen wurden 4 Tage lang N-arm auf o,5% Asparagin in der Wöltje-Lösung vorgezogen und dann auf eine Salzlösung umgepflanzt, die entsprechend dem Wölt= je-Medium o,5% Kalium-dihydrogenphosphat (n. SÖRENSEN) und o,25% Magnesium-sulfat · 7 H_2O enthielt und der als einziges orga= nisches Substrat jeweils

DL-Kynurenin (Fa. Schuchardt)
3-Hydroxy-anthranilsäure (Fa. Fluka) oder
Chinolinsäure (Fa. Schuchardt)

in N-äquivalenter Menge zu o,1% Asparagin (= Vergleichskultur)

zugesetzt worden war. Die Ernte der Kulturen wurde zum Zeitpunkt der Umpflanzung und zu den in den Abbildungen angegebenen Zeiten nach der Umpflanzung durchgeführt.

2. Nicotinsäure-Synthese über den Tryptophan-Abbauweg in ruhenden Kulturen von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s

a) DL-Kynurenin: Wie die in Abb.16 dargestellten Ergebnisse zeigen, steigt in einer ruhenden Kultur von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s auf o,14% DL-Kynurenin (= o,1% Asparagin-N) der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt nach 18 h um 7o% an, während das Pilztrockengewicht und der Gesamt-N-Gehalt dieser Kultur sich nur unwesentlich verändern. Bei der auf o,1% Asparagin

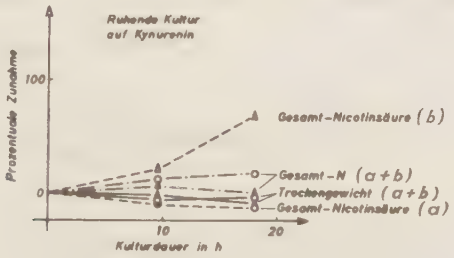


Abbildung 16: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : N-arme Vorzucht, danach Umpflanzung auf Wöltje-Nährlösung ohne Saccharose mit a) o,1% Asparagin und b) DL-Kynurenin (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung angegeben. Mittelwerte aus je vier Kulturschalen.

gezogenen Vergleichskultur ist dagegen ein Abfall des Nicotinsäure-Gehaltes, gleichzeitig eine Trockengewichtsverminderung, aber ein kleinerer Anstieg im Gesamt-N-Gehalt zu beobachten. Der Anstieg des N-Gehaltes ist hier zu gering, um eine deutliche Erhöhung des Nicotinsäure-Gehaltes zu bewirken (vgl. die Abhängigkeit der Nicotinsäure-Bildung von der N-Aufnahme in Abb.7 bis 9), vielmehr läuft die beobachtete Abnahme des Nicotinsäure-Gehaltes mit der einer älteren Normal-Kultur (1% As-

paragin) parallel, bei der infolge von Autolyseerscheinungen der Gehalt abnimmt. - Daß in der Kynurenin-Kultur trotz der geringen N-Aufnahme der Nicotinsäure-Gehalt stark zunimmt, muß auf eine Vorstufen-Funktion des Kynurenins für die Nicotinsäure-Bildung zurückzuführen sein.

b) 3-Hydroxy-anthranilsäure: Eine Umpflanzkultur auf 3-Hydroxyanthranilsäure brachte ähnliche Ergebnisse wie die der Kynurenin-Versuchsreihe (Abb.17). Bei gleichzeitiger geringer Verminderung des Gesamt-N und des Trockengewichtes einer Kultur-

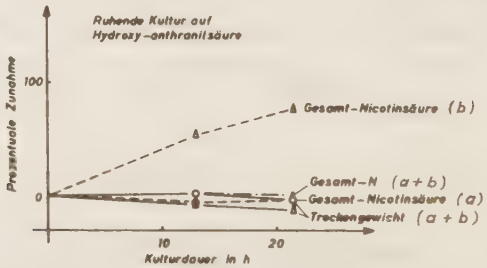


Abbildung 17: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : N-arme Vorzucht, danach Umpflanzung auf Wöltje-Nährlösung ohne Saccharose mit a) o,1% Asparagin und b) 3-Hydroxy-anthranilsäure (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung angegeben.
Mittelwerte aus je vier Kulturschalen.

schale steigt der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt nach 21 h Kulturdauer um etwa 8o% an. Der Nicotinsäure-Spiegel von 1 g Trockensubstanz erhöht sich damit von 91 auf 18o µg, während für die Kontrollkultur mit 9o µg der gleiche Gehalt wie zum Zeitpunkt der Umpflanzung nachgewiesen wurde.

c) Chinolinsäure: Da im Tryptophan-NAD-Metabolismus die Chinolinsäure als unmittelbare Vorstufe der als Pyridinnucleotid-Baustein auftretenden Nicotinsäure anzusehen ist (vgl. Abb.1, S. 7), sollte nach den vorher beschriebenen Versuchen vor

allem bei einer Kultur auf dieser Substanz ein Anstieg des Nicotinsäure-Gehaltes erwartet werden. Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen fördert jedoch Chinolinsäure die Nicotinsäure-Synthese wesentlich geringer als Kynurenin und 3-Hydroxy-anthranilsäure. Während die letztgenannten Substrate den Nicotinsäure-Gehalt (berechnet auf 1 g Trockensubstanz) von 1o9 auf 199 µg beziehungsweise von 91 auf 18o µg um jeweils 9o µg ansteigen lassen, erhöht sich der Nicotinsäure-Gehalt in der Chinolinsäure-Kultur nur um 46 µg (Abb.18). - In weiteren Versuchen müßte geklärt werden, welche Mechanismen die verringerte Synthese von Nicotinsäure bei Chinolinsäure-Gaben bedingen.

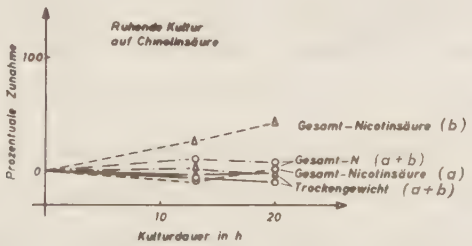


Abbildung 18: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : N-arme Vorzucht, danach Umpflanzung auf Wöltje-Nährlösung ohne Saccharose mit a) o,1% Asparagin und b) Chinolinsäure (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung angegeben. Mittelwerte aus je vier Kulturschalen.

3. Nicotinsäure-Synthese über den Tryptophan-Abbauweg in ruhenden Kulturen von T o r u l o p s i s u t i l i s

a) DL-Kynurenin: In Abb.19 ist die prozentuale Zunahme des Gesamt-Nicotinsäure-Gehaltes einer auf DL-Kynurenin gehaltenen T o r u l o p s i s -Kultur wiedergegeben worden. Bei fast gleichbleibendem Trockensubstanzgewicht und Gesamt-N-Gehalt ei=

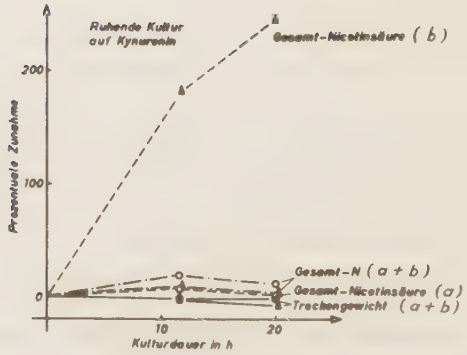


Abbildung 19: T o r u l o p s i s u t i l i s : N-arme Vorzucht, danach Umpflanzung auf Wöltje-Nährlösung ohne Saccharose mit a) o,1% Asparagin und b) DL-Kynurenin (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung angegeben. Mittelwerte aus je vier Kulturschalen.

ner Kulturschale erhöht sich der Nicotinsäure-Gehalt um etwa 24o%. Dieser sprunghafte Anstieg weist darauf hin, daß auch bei T o r u l o p s i s u t i l i s die Nicotinsäure-Bildung über den Tryptophan-Abbauweg erfolgt. - Werden die erhaltenen Nicotinsäure-Werte auf 1 g Trockensubstanz berechnet, so wird deutlich, daß T o r u l o p s i s u t i l i s unter diesen Bedingungen mit 795 µg einen sehr viel höheren Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt hat als die Aufwuchskulturen bei N-reicher Anzucht auf Asparagin (Maximalwert ca. 4oo µg; siehe Tab.6 auf S. 37).

b) 3-Hydroxy-anthranilsäure: T o r u l o p s i s u t i l i s kann 3-Hydroxy-anthranilsäure noch wesentlich besser zur Nicotinsäure-Synthese nutzen als Kynurenin. Der Gesamt-Nicotinsäure-Spiegel dieser Kulturen steigt nämlich nach 21 h Kultur=

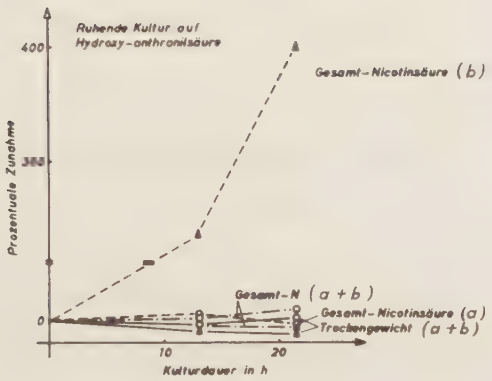


Abbildung 2o: T o r u l o p s i s u t i l i s : N-arme Vorzucht, danach Umpflanzung auf Wöltje-Nährlösung ohne Saccharose mit a) o,1% Asparagin und b) 3-Hydroxy-anthranilsäure (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung angegeben.
Mittelwerte aus je vier Kulturschalen.

dauer von 2o9 auf 1175 µg pro 1 g Trockensubstanz an und erreicht damit einen dreimal so hohen Wert wie das Maximum einer normalen Aufwuchskultur auf 1% Asparagin (vgl. Tab.6 auf S. 37). In Abb.2o ist dieser steile Anstieg um 4oo% graphisch wiedergegeben worden. - Daß von T o r u l o p s i s u t i l i s ein derart hoher Gesamt-Nicotinsäure-Spiegel in den Zellen erreicht werden kann, stimmt mit den Angaben älterer Literatur überein. J.C. LEWIS (1944) konnte zeigen, daß der Stamm Y 9oo bei einer Anzucht unter Eisen-ionen-Abwesenheit zwischen 1ooo und 12oo µg Nicotinsäure pro 1 g Trockensubstanz synthetisiert.

c) Chinolinsäure: Die Ergebnisse der Versuchsreihen von T o r u l o p s i s u t i l i s mit Chinolinsäure sind in Abb.21 wiedergegeben worden. Der Nicotinsäure-Gehalt dieser Kulturen

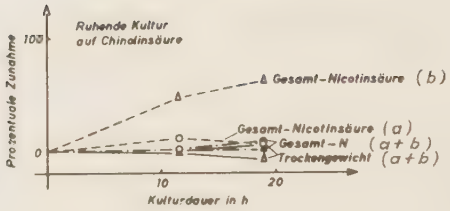


Abbildung 21: T o r u l o p s i s u t i l i s : N-arme Vorzucht, danach Umpflanzung auf Wöltje-Nährlösung ohne Saccharose mit a) o,1% Asparagin und b) Chinolinsäure (N-äquivalent zu a). Die Analysenwerte sind alle als prozentuale Zunahme gegenüber den Werten zum Zeitpunkt der Umpflanzung angegeben. Mittelwerte aus je vier Kulturschalen.

steigt nach 19 h Kulturdauer nur um 6o% (vgl. Abb.19 und 2o). Es zeigt sich damit, daß T o r u l o p s i s u t i l i s Chinolinsäure weitaus weniger zur Nicotinsäure-Bildung nutzen kann als die beiden zuvor beschriebenen Zwischenprodukte der Biosynthese. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Befunden bei E n d o m y c o p s i s (vgl. Abb.18), die ebenfalls Chinolinsäure weniger gut für die Nicotinsäure-Synthese zu nutzen vermag als die anderen gebotenen Vorstufen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen über die Beeinflussung der Nicotinsäure-Synthese von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p s i s u t i l i s lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Beide Organismen werden unter den Bedingungen einer ruhenden Kultur (ohne C-Quelle) durch geringe Gaben von DL-Kynurenin, 3-Hydroxy-anthranilsäure und Chinolinsäure (berechnet auf o,1% Asparagin-N) stark zur Nicotinsäure-Bildung angeregt. Da der Gehaltsanstieg teilweise sehr hoch ist und die genannten Verbindungen als Zwischenprodukte

bei der Biosynthese der Nicotinsäure aus Tryptophan auftreten (vgl. hierzu Abb.1, S. 7), kann geschlossen werden, daß Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis Nicotinsäure über den Tryptophan-Abbauweg synthetisieren. - Torulopsis utilis bildet unter gleichen Versuchsbedingungen drei- bis fünfmal so viel Nicotinsäure wie Endomycopsis vernalis. - Für die geringere Nutzung der Chinolinsäure zur Nicotinsäure-Bildung kann z.Z. keine Erklärung gegeben werden.

4. Der Nicotinsäure-Gehalt anaerob gezogener Umpflanzkulturen von Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis auf Asparaginsäure und Glycerin

Saccharomyces cerevisiae (Fleischmann-Stamm 139) bildet unter aeroben Kulturbedingungen Nicotinsäure über den Tryptophan-Abbauweg. Unter anaeroben Bedingungen geht jedoch die Synthese von Asparaginsäure oder Glutaminsäure aus (F. AHMAD u. A.G. MOAT, 1966). H.-D. HEILMANN u. F. LINGENS (1968) konnten zudem zeigen, daß ein anderer Stamm (S. cerevisiae -Stamm S 288 c) beide Synthesewege gleichzeitig - wenn auch den Tryptophan-Abbauweg bevorzugt - zur Nicotinsäure-Bildung beschreitet. Damit ist dieser Hefe ein Alternativweg zur Nicotinsäure-Bildung gegeben, wenn unter anaeroben Bedingungen ein oxydativer Tryptophan-Abbau nicht möglich ist. Es schien deshalb nicht ausgeschlossen zu sein, daß auch bei den Hefen Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis die Synthese von Nicotinsäure aus Asparaginsäure und einer C_3-Verbindung möglich ist. Zur Nachprüfung dieses Bildungsweges wurden aerob vorgezogene Pilzdek-

ken der Versuchsorganismen unter anaeroben Kulturbedingungen auf einem neuen Nährmedium, das Asparaginsäure und Glycerin als Substrat enthielt, weiterkultiviert. Aus dem Anstieg des Nicotinsäure-Gehaltes dieser Kulturen, bezogen auf den Gehalt zum Zeitpunkt der Umpflanzung und den der aerob gezogenen Vergleichskultur, sollten Hinweise auf eine mögliche Bildung des Vitamins aus C_3- und C_4- Bausteinen erhalten werden.

Versuchsansatz: Die anaeroben Umpflanzkulturen wurden in Exsikkatoren gehalten. Zu diesem Zweck wurde der Tubus im Exikkatordeckel mit einem Gummistopfen verschlossen, durch den zwei Glaskanülen für den Gasaustausch führten. Die Begasung wurde mit einem Gemisch aus 85% N_2 und 15% CO_2 (Prüfgas-qualität, Fa. Lindes Eismaschinen, Sauerstoff-Gehalt weniger als o,oo5%) durchgeführt. Die Prüfung auf Sauerstoff-Freiheit des austretenden Gases erfolgte nach der bei den Arbeitsvorschriften gegebenen Methode (S. 12). Die so geschaffenen Kulturkammern wurden durch UV-Bestrahlung weitgehend keimfrei gemacht; das Gasgemisch wurde durch zwei hintereinandergeschaltete Waschflaschen in die Kulturkammern geleitet.

Die Versuchsorganismen wurden für die Untersuchungen 4 Tage lang N-arm auf o,25% (E n d o m y c o p s i s) und o,5% (T o r u l o p s i s) Asparagin vorgezogen. - Die Nährlösung für die Umpflanzkulturen hatte folgende Zusammensetzung:

1,25 g Kalium-dihydrogenphosphat (n. SÖRENSEN, Fa. Merck)
o,63 g Magnesium-sulfat · 7 H_2O (Fa. Merck)
2,16 g Natrium-L-asparaginat (= o,o5 molar; Fa. Schuchardt)
1,66 g L-Asparaginsäure (= o,o5 molar; Fa. Merck)
2,3 g Glycerin (= o,1 molar; Fa. Merck)
in 25o ml wässriger Lösung

Die Nährlösungen wurden auf den pH-Wert 4,o eingestellt und zweimal fraktioniert sterilisiert. - Die vorbereiteten Kulturschalen (Methode siehe S. 12) wurden zum weitgehenden O_2-Entzug aus der Nährlösung vor der Umpflanzung etwa 5 h lang in den Exsikkatoren mit dem N_2/CO_2-Gemisch begast (die Schalendeckel waren für einen ausreichenden Gasaustausch einseitig leicht angehoben). Dann wurden rasch unter keimfreien Bedingungen bei abgehobenem Exsikkatordeckel und starkem Gasstrom die N-arm angezogenen Pilzdecken umgepflanzt. Die Deckel wurden sofort verschlossen und die Kulturen etwa 1 h lang bei starkem Gasstrom belassen bis im ausströmenden Gas kein Sauerstoff mehr nachweisbar war. Danach wurde der Gasstrom reduziert. - Die Ernte erfolgte nach 0, 6, 12 und 24 h anaerober Kulturdauer.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab.9 und 1o zusammengestellt worden. Sowohl E n d o m y c o p s i s als

auch T o r u l o p s i s zeigen unter anaeroben Kulturbedin= gungen kein Wachstum. Das Pilztrockengewicht einer Schale nimmt während der 24 Kulturstunden laufend ab. - Der Gesamt-N-Gehalt (Spalte 3) der Trockensubstanz beider Kulturen ändert sich da= bei nur unwesentlich: Er nimmt bei E n d o m y c o p s i s zunächst bis 12 h nach Kulturbeginn etwas zu, fällt aber bei 24 Kulturstunden auf den Ausgangswert zurück, während er bei T o =

Tabelle 9: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : Trocken= substanz, Gesamt-Stickstoff- und Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt der Umpflanzkulturen auf Asparaginsäure und Glycerin unter aeroben und anaeroben Kulturbedingungen.

Kultur= dauer h	Trockensub= stanz mg		Gesamt-N mg		Gesamt-Ni= cotinsäure µg		Ges.-Nic.sre. /g Tr.subst. µg	
	aer.	anaer.	aer.	anaer.	aer.	anaer.	aer.	anaer.
0	254		5,o		13,7		54	
6	258	241	6,3	5,5	13,9	12,8	54	53
12	291	246	8,1	5,4	19,3	11,6	66	47
24	316	232	12,6	4,9	18,2	1o,7	58	46,o

Tabelle 1o: T o r u l o p s i s u t i l i s : Trockensubstanz, Gesamt-Stickstoff- und Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt der Umpflanz= kulturen auf Asparaginsäure und Glycerin unter aeroben und an= aeroben Kulturbedingungen.

Kultur= dauer h	Trockensub= stanz mg		Gesamt-N mg		Gesamt-Ni= cotinsäure µg		Ges.-Nic.sre. /g Tr.subst. µg	
	aer.	anaer.	aer.	anaer.	aer.	anaer.	aer.	anaer.
0	191		7,6		41,6		218	
6	193	19o	8,6	8,3	47,6	42,7	247	221
12	226	186	9,9	8,2	55,o	38,1	243	2o5
24	262	174	12,3	8,6	64,3	29,7	246	17o

l o p s i s innerhalb 24 h langsam um 1 mg ansteigt. - Der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt fällt bei beiden anaerob gezogenen

Kulturen mit Beginn der anaeroben Bedingungen stetig ab. Es ist bemerkenswert, daß dieser Abfall stärker ist als die Gehaltsminderung, die in aerob gehaltenen Kulturen bei minimalem N- und C-Angebot (o,1% Asparagin; siehe z.B. Abb.16, S. 63) nachgewiesen wurde. Aus dem Gehaltsanstieg der Gesamt-Nicotinsäure in den aerob gehaltenen Kulturen ist bei beiden Versuchsorganismen kein stimulierender Effekt auf die Synthese dieser Verbindung zu erkennen: Die Zunahme um 3o bis 4o% bei E n d o m y c o p s i s und um 5o% bei T o r u l o p s i s liegt bei der hohen N-Aufnahme (siehe die Spalten 3 in Tab.9 und 1o) noch wesentlich unter den Anstiegswerten, die mit anderen N-Quellen erhalten wurden (vgl. Abb.1o und 14, S.52 und 58). Aus diesen Werten muß geschlossen werden, daß sowohl E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s als auch T o r u l o p s i s u t i l i s unter den geschilderten Versuchsbedingungen Nicotinsäure über den "Asparaginsäure"-Weg nicht zu synthetisieren vermögen.

5. Untersuchungen zur Nicotinsäure-Synthese bei E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s mit ^{14}C(U)-L-Asparaginsäure

Zur weiteren Klärung der Frage, ob bei E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s das Asparaginsäure-Molekül unmittelbar zur Nicotinsäure-Synthese verwandt wird, wurde der Hefe ^{14}C-markierte Asparaginsäure als N-Quelle geboten. Ein Einbau des C-Gerüstes dieser Aminosäure in das Nicotinsäure-Molekül mußte zu radioaktiver Nicotinsäure und ihren Derivaten führen, die sich in Autoradiogrammen qualitativ nachweisen lassen (vgl.

Versuchsanordnung: E n d o m y c o p s i s wurde 4 Tage lang in kleinen Petrischalen mit einem Durchmesser von 35 mm auf o,5% Asparagin in der Wöltje-Lösung vorgezogen und dann auf eine neue Wöltje-Lösung umgepflanzt, die o,4% (= o,o3 molar)

eines Gemisches aus radioaktiver und inaktiver L-Asparaginsäure [o,1 mC ^{14}C(U)-L-Asparaginsäure (1o6 mC/mMol) verdünnt mit 199,5 mg L-Asparaginsäure/5o ml Nährlösung] als N-Quelle und o,55% (= o,o6 molar) Glycerin als C-Quelle enthielt. pH-Wert der Nährlösung 4,1. Die Umpflanzkulturen wurden nach 6 und 18 h Kulturdauer geerntet.

Zum Nachweis der Nicotinsäure und des Nicotinsäureamids im Zellmaterial und Kulturfiltrat (Restnährlösung und Waschflüssigkeit) wurden die geernteten Kulturen nach der auf S. 17ff beschriebenen Methode aufgearbeitet und zweidimensional papierchromatographisch (a) oder nach Anreicherung über eine Dowex-Säule dünnschichtchromatographisch (b) mittels Co-Chromatographie auf Nicotinsäure und Nicotinsäureamid analysiert. R_f-Werte in 1./2. Laufrichtung: a) Nicotinsäure o,76/o,18, Nicotinsäureamid o,65/o,61; b) Nicotinsäure o,7o/o,27, Nicotinsäureamid o,43/o,71.

E. MOTHES, 1964). Die Untersuchungen und ihre Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Weder im Alkoholextrakt des Mycels noch im Kulturfiltrat konnte ^{14}C-markierte Nicotinsäure oder Nicotinsäureamid gefunden werden. - Da bei den zuvor beschriebenen Untersuchungen die erfaßbaren Nicotinsäure-Konzentration sehr klein waren, wurden der zur Trockne eingeengte Alkoholextrakt und das Kulturfiltrat zur Erfassung der Gesamt-Nicotinsäure jeweils einer alkalischen Hydrolyse unterworfen und - ebenso das Hydrolysat des extrahierten Zellrückstandes - über eine Dowex-säule angereichert. - Auf den mit eingeengten Fraktionen angefertigten Dünnschichtchromatogrammen (zweidimensional) war die Nicotinsäure zwar chemisch gut nachweisbar, jedoch waren die Nicotinsäure-Flecken im Autoradiogramm unmarkiert.

Die Versuchsergebnisse mit der ^{14}C-markierten Aminosäure zeigen, daß für E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s unter den hier geschilderten Versuchsbedingungen Asparaginsäure nicht eine Vorstufe für Nicotinsäure (über den verkürzten Biosyntheseweg, siehe Abb.1, S.7) ist.

V. EIGENSCHAFTEN DER NICOTINSÄUREAMID-DESAMIDASEN VON ENDOMYCOPSIS VERNALIS UND TORULOPSIS UTILIS

Durch Suspensionen abgetöteter Zellen sowie durch Trockenpulverpräparate von Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis wird in Nicotinsäureamid-Lösungen Ammoniak freigesetzt (H. KATING, 1959). Aus dem gleichzeitigen Auftreten von Nicotinsäure in der Inkubationslösung, die papierchromatographisch nachgewiesen wurde, und aus der von beiden Organismen unterschiedlich gebildeten NH_3-Menge wurde geschlossen, daß Endomycopsis eine wesentlich schwächere Nicotinsäureamid-desamidase-Aktivität besitzt als Torulopsis (siehe auch H. KATING u. G. DREPHAL, 1966). Diese Befunde waren der Anlaß, die Desamidierung von Nicotinsäureamid durch die beiden Hefen eingehender zu prüfen und die nachweisbare Desamidase durch Untersuchungen mit zellfreien Extrakten näher zu charakterisieren.

Die enzymatische Spaltung von Nicotinsäureamid zu Nicotinsäure und Ammoniak wurde erstmals von D.E. HUGHES u. D.H. WILLIAMSON

(1953) in Lactobacillus arabinosus erkannt. Seit dieser Zeit konnte die Nicotinsäureamid-desamidase (Acylamid-amidohydrolase, EC 3.5.1.4) auch in einer Reihe anderer Bakterien (u.a. Y.S. HALPERN u. N. GROSSOWICZ, 1957), in Pilzen (u.a. D.S.R. SARMA u. Mitarb., 1962), höheren Pflanzen (u.a. M.A. MUKUNDAN u. Mitarb., 1961) und Säugetieren (u.a. B. PETRACK u. Mitarb., 1963) nachgewiesen werden. - Der Nicotinsäureamid-desamidase kommt im Stoffwechsel der Pyridinnucleotide eine bedeutende Funktion zu (siehe R.K. GHOLSON, 1966). Durch ihre Wirkung wird das Nicotinsäureamid, das bekanntlich durch den Abbau von NAD oder NADP frei in der Zelle auftritt, zu Nicotinsäure hydrolysiert, die dann wiederum zur Resynthese von NAD über den PREISS-HANDLER-Stoffwechselweg genutzt werden

kann (J.G. JOSHI u. P. HANDLER, 1962; J. PREISS u. P. HANDLER, (1958). Das Fehlen dieses Enzyms z.B. bei L e u c o n o s t o c m e s e n t e r i o i d e s ist der Grund dafür, daß dieser Organismus, der Nicotinsäure als essentiellen Wuchsstoff benötigt, mit Nicotinsäureamid nicht zu wachsen vermag (T.K. SUNDARAM u. Mitarb., 1960).

1. Die Nicotinsäureamid-desamidase von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s

a) Nachweis einer Desamidase-Aktivität im Acetonpulver

In Erweiterung der von H. KATING (siehe oben) beschriebenen Versuche, die mit durch Chloroform abgetöteten Zellen in phosphatgepuffertem Medium durchgeführt wurden, sollte geprüft werden, ob auch mit Suspensionen von Acetontrockenpulvern (Herstellung siehe Analysenmethoden, S.19) eine hydrolytische Spaltung des Nicotinsäureamids nachweisbar ist. Zu diesem Zweck wurden jeweils 0,5 ml Suspension (100 mg Acetonpulver in 5 ml deionisiertem Wasser) mit 10 µMol Nicotinsäure in 0,05 molarer Phosphatpuffer-Lösung (pH-Wert 7,0; 1 ml Gesamtvolumen) 1 h lang bei 37°C inkubiert. Die Reaktionslösungen wurden dann mittels der Conway-Methode (siehe Arbeitsvorschriften S. 123) auf ihren NH_3-Gehalt sowie dünnschichtchromatographisch auf freie Nicotinsäure hin untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab.11 aufgeführt worden. Durch Subtraktion der NH_3-Titrierwerte der Ansätze Nr.2 und Nr.3 (= präformiertes NH_3) vom Wert des Analysenansatzes (Nr.1) errechnen sich 0,23 µMol NH_3, die unter den genannten Versuchsbedingungen in 1 ml Reaktionslösung freigesetzt wurden. Daß dieser Ammoniak durch Hydrolyse aus Nicotinsäureamid entstanden ist, konnte durch das Auftreten von Nicotinsäure in der Reaktionslösung dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden.

Tabelle 11: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : Nicotinsäureamid-desamidase-Aktivität im Acetontrockenpulver. o,5 ml Suspension (1oo mg/5 ml) inkubiert mit 1o µMol Nicotinsäureamid in Phosphatpuffer (o,o5 molar, pH-Wert 7,o), 1 ml Gesamtvolumen; Inkubationszeit 1 h bei 37° C.

Ansatz Nr.	Suspension o,5 ml	Nicotinsäure-NH_2 1o µMol	Titrierwerte in µl o,o1 n HCl	Chromatographie Nicotinsäure	Chromatographie Nicotinsäure-NH_2
1	+	+	o,o72 o,o76	+	+
2	+	-	o,o35 o,o32	-	-
3	-	+	o,o17 o,o18	-	+
4	+ (hitzedenaturiert)	+	o,o26 o,o23	-	+

Die hitzedenaturierte Suspension (5 min in kochendem Wasserbad) erbrachte keine Hydrolytische Spaltung des eingesetzten Nicotinsäureamids (Nr.4). - Da also auch im Acetonpulver von E n d o m y c o p s i s eine deutliche Nicotinsäureamid-desamidase-Wirkung vorhanden ist, wurden die weiteren Untersuchungen mit zellfreien Acetonpulver-Extrakten durchgeführt.

b) Die spezifische Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase

Vorversuche zur Extrahierbarkeit der Desamidase mit deionisiertem Wasser oder Pufferlösung hatten gezeigt, daß erst in einem Extrakt aus einer relativ hohen Acetonpulver-Menge (15o mg/5 ml Lösungsmittel = 6oo bis 8oo µg Protein/o,5 ml) eine deutliche Desamidierung nachweisbar war, wobei im extrahierten Rückstand noch eine höhere Aktivität verblieb. Obwohl eine mikroskopische Kontrolle der verschiedensten Acetonpulverpräparate maximal 6o% zerstörte Zellen anzeigte - mit der eine Restaktivität im Rückstand erklärt werden könnte - muß wegen des unterschiedlichen Verhältnisses der Aktivitäten im Extrakt und extrahierten Rückstand (ca. 1 : 2; statt bei 6o% Zerstörung 6 : 4) auf Vorhandensein einer unlösbaren Desamidase geschlossen werden.

Analysenanordnung: o,5 ml Acetonpulver-Extrakt wurden mit 1o µMol Nicotinsäureamid 2 h lang in o,o5 molarer Phosphat-Pufferlösung (1 ml Endvolumen) bei 3o° C inkubiert. Der nach der Mikrodiffusionsmethode bestimmte Ammoniak in der Reaktionslösung (Titration mit o,o1 n HCl) wurde durch zwei Blindwert-Analysen, die a) mit dem gepufferten Extrakt und b) mit dem Substrat durchgeführt wurden, korrigiert. - Eine Einheit der Nicotinsäureamid-desamidase ist ausgedrückt als die Enzymmenge, die in 1 h Inku-

bationsdauer bei 3o°C 1 µMol NH_3 freigesetzt; die spezifische Aktivität des Enzyms wird angegeben in Einheit pro 1 mg Protein.

Für die Nicotinsäureamid-desamidase-Aktivität verschiedener Mikroorganismen sind in der Literatur unterschiedliche pH-Optimumskurven angegeben worden. So liegt das pH-Optimum z.B. bei A s p e r g i l l u s n i g e r bei 7,5 (D.S.R. SARMA u. Mitarb., 1964), bei einigen M y c o b a c t e r i u m -Arten im pH-Bereich von 8 bis 9 (G.N. PERSHIN u. V.V. NESVADBA, 196o) oder bei Ascites-Tumor-Zellen um den pH-Wert 6,o (F. MÄRKI u. P. GREENGARD, 1966). Um die für die E n d o m y c o p s i s - Desamidase-Aktivität optimalen Pufferbedingungen zu bestimmen, wurden Versuchsreihen mit Phosphat-Puffer (pH-Bereich 4,9 bis 8,1) und Tris-Acetat-Puffer (pH-Bereich 7,8 bis 9,2) durchgeführt.

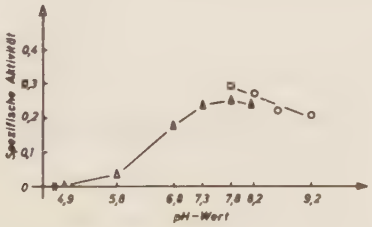


Abbildung 22: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase vom pH-Wert und dem Puffersystem der Reaktionslösung. △——△= Phosphat-Puffer, O——O= Tris-Acetat-Puffer. Mittelwerte aus je zwei Parallelansätzen.

Die Ergebnisse sind in Abb.22 dargestellt worden. Danach liegt das pH-Optimum für die Desamidase-Aktivität von E n d o m y c o p s i s bei 7,8. Die steigende Aktivität im Tris-Puffer-System mit zunehmender Acidität des Mediums ließ erwarten, daß mit anderen Tris-Puffern, z.B. Tris-Sulfat-Puffer (pH-Bereich

6,5 bis 8,o), ein weiterer Aktivitätsanstieg erhalten werden konnte. Im Verlauf dieser Untersuchungen stellte sich aber ein Befund heraus, durch den die Bestimmungen im Tris-Puffer zweifelhaft wurden: Die Blindwerte aus den Ansätzen mit den substratfreien Extrakten (vgl. Tab.11, Ansatz Nr.2) waren auffallend höher als in den entsprechenden Ansätzen mit Phosphat-Puffer, obwohl im Tris-Puffer selbst nur geringe Mengen freien Ammoniaks gefunden wurden. Weiterhin wurde bei einem Zusatz von 1 µMol Mn^{++} zu den Inkubations-Lösungen eine erneute Erhöhung dieser Blindwerte um das 2 1/2fache beobachtet. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, daß durch die Acetonpulver-Extrakte das Tris(hydroxymethyl)aminomethan enzymatisch gespalten wird, wobei Mn^{++}-ionen die hydrolytische Spaltung aktivieren. - Es müßte in weiteren Versuchen geklärt werden, ob E n d o m y c o p s i s eine für dieses quartäre Ammoniumion spezifische Hydrolase besitzt. - Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die folgenden Untersuchungen mit Phosphat-Puffer durchgeführt.

Nach der in Abb.22 dargestellten Aktivitätskurve, ist die höchste spezifische Aktivität der E n d o m y c o p s i s -Desamidase mit o,25 bis o,26 µMol NH_3/mg Protein im pH-Bereich von 7,3 bis 8,1 gemessen worden.

In Abb.23 ist die Abhängigkeit der enzymatisch gebildeten NH_3-Menge von der Reaktionsdauer graphisch dargestellt worden. Die Hydrolyse des Nicotinsäureamids steigt mit fortschreitender Inkubationsdauer an. Es fällt aber in dieser Darstellung auf, daß der Anstieg der NH_3-Werte nur annähernd linear ist und mit fort=

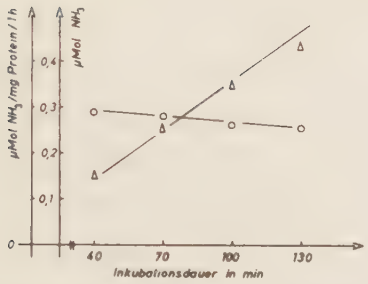


Abbildung 23: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : Abhängigkeit der Nicotinsäureamid-desamidase-Aktivität von der Inkubationsdauer. Δ —— Δ = freigesetztes Ammoniak aus Nicotinsäureamid, O —— O = spezifische Aktivität (= µMol NH_3/mg Protein/6o min 3o°C). Mittelwerte aus je zwei Parallelansätzen.

schreitender Inkubationsdauer ein leichter Abfall der spezifischen Aktivität eintritt. Da mit anderen Substratkonzentrationen (6 µMol und 2 µMol Nicotinsäureamid) dieselben Erscheinungen auftraten, ist dies ein Hinweis auf eine Instabilität des Enzyms.

c) Einfluß der Temperatur auf die Stabilität

Um den Einfluß der Temperatur auf die Nicotinsäureamid-desamidase-Aktivität sowie die Temperaturempfindlichkeit des Enzyms zu bestimmen, wurde die zweistündige Inkubation der Extrakte mit dem Substrat bei Temperaturen zwischen 1o° und 55°C durchgeführt. Zum anderen wurden die jeweiligen Extrakte 3o min lang den Temperaturen zwischen 3o° und 55°C ausgesetzt, bevor sie dann 2 h lang bei 3o°C zur Inkubation mit dem Nicotinsäureamid eingesetzt wurden.

Aus den in Abb.24 graphisch dargestellten Analysenergebnissen ist zu ersehen, daß nach zweistündiger Inkubationsdauer die

höchsten NH_3-Mengen bei 33° C gemessen werden. Während zwischen 1o° und 33° C die NH_3-Werte in der Inkubationslösung stetig zunehmen, fallen sie bereits bei einer Temperatur von 35° C deutlich ab. Bei 52° C sind nur noch Spuren von freigesetztem NH_3 nachweisbar; bei 55° C ist das Enzym inaktiv. - Die Aktivitätsminderung ab 35° C bestätigt die bei den zuvor beschriebenen Untersuchungen beobachtete Instabilität, die demnach auf eine starke Wärmeempfindlichkeit zurückgeführt werden muß.

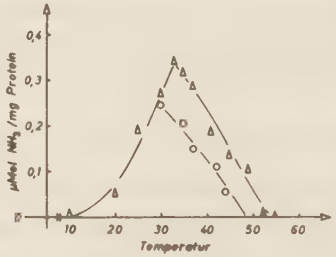


Abbildung 24: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : Einfluß der Temperatur auf die spezifische Nicotinsäureamid-desamidase-Aktivität. Δ——Δ = µMol NH_3 (berechnet auf 1 mg Protein) nach 2 h Inkubation bei angegebener Temperatur. o——o = µMol NH_3; 3o min Präinkubation bei angegebener Temperatur, danach Inkubation mit dem Substrat 2 h bei 3o° C. Mittelwerte aus je zwei Parallelansätzen.

Die große Wärmeempfindlichkeit dieser Desamidase kommt weiterhin in der modifizierten Versuchsanordnung zum Ausdruck: Durch die 3o min lange vorhergehende Erwärmung des Acetonpulver-Extraktes auf die in Abb.24 angegebenen Temperaturen und die dann erst erfolgende Substratzugabe und Reaktion bei 3o° C (2 h lang) wird ersichtlich, daß schon bei einer Erwärmung bei 3o° C eine auffallende Inaktivierung des Enzyms beginnt. Bei 37° C beträgt der Aktivitätsverlust über 5o% und bei 49° C ist überhaupt keine Aktivität des Enzyms mehr nachweisbar. - Demnach besitzt E n d o m y c o p s i s eine sehr wärmeempfindliche Nicotinsäure-

amid-desamidase, die bereits bei mäßig erhöhten Temperaturen inaktiviert wird. Auch ein Zusatz von 5 µMol L-Cystein oder 5 µMol 2-Mercaptoäthanol zur Reaktionslösung brachte keine Aktivitätssteigerung bei 33° oder 37°C.

Bei einer Aufbewahrung unter Feuchtigkeitsausschluß bei ± 0 bis 2°C ist das Acetonpulver über eine Woche lang ohne merklichen Aktivitätsverlust der Desamidase gut haltbar. Jedoch 35 Tage alte Acetonpulver, die unter diesen Bedingungen aufbewahrt wurden, zeigten nur noch eine Aktivität von 7o%.

d) Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Kulturdauer

Die Untersuchungen über die Gesamt-Nicotinsäure-Bildung von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s (siehe unter C II., S. 36) hatten gezeigt, daß die jungen Kulturen den höchsten prozentualen Gehalt besitzen, der mit fortschreitendem Kulturalter stetig abnimmt. In diesem Zusammenhang war es von Interesse, die spezifische Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase im Verlauf der Kulturdauer zu bestimmen, zumal G.N. PERSHIN u. V.V. NESVADBA (196o) für die M y c o b a c t e r i u m -Desamidase keine Abhängigkeit der Aktivität vom Kulturalter nachweisen konnten.

In Abb.25 ist die spezifische Aktivität zum Zeitpunkt der jeweiligen Ernten einer E n d o m y c o p s i s -Aufwuchskultur (1% Asparagin als N-Quelle) wiedergegeben worden. Junge, 58 h alte Kulturen besitzen danach mit o,125 µMol NH_3/mg Protein/ 6o min Reaktionsdauer eine sehr niedrige spezifische Aktivität. Nach 9o h Kulturdauer ist diese zwar auf das Dreifache angestiegen (o,318 µMol NH_3), sie fällt dann aber im weiteren Kultur-

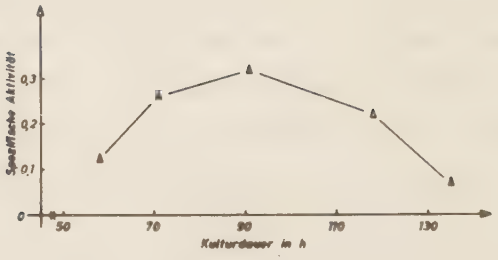


Abbildung 25: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : Spezifische Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Mittelwerte aus je zwei Parallelansätzen.

verlauf stetig ab und besitzt nach 135 Kulturstunden nur noch einen Wert von o,o68. Der Anstieg der spezifischen Desamidase-Aktivität während der ersten Kulturhälfte ist sicher mit dem intensiven Stoffwechsel der stark wachsenden Kultur zu erklären. Der Aktivitätsabfall in der zweiten Kulturhälfte hingegen muß im Zusammenhang mit der sich erschöpfenden Nährquelle gesehen werden, wenn eine Neusynthese des Enzyms offensichtlich stark reduziert wird.

e) Einfluß chemischer Agentien auf die Desamidase-Aktivität

Zur weiteren Charakterisierung der Nicotinsäureamid-desamidase von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s wurde der Einfluß von metallkomplex-bildenden Substanzen sowie von Metallionen auf die enzymatische Aktivität untersucht: Der Zusatz von 1 µMol Magnesium-chlorid zur Inkubationslösung hat praktisch keinen Einfluß auf die enzymatische Spaltung von Nicotinsäureamid (Tab.12). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß in Vorversuchen zur Desamidase-Wirkung in zellfreien Extrakten ein Zusatz von 5 µMol Mg^{++}-ionen (zusammen mit 5 µMol ATP) ebenfalls keine Aktivitätssteigerung oder -verminderung erkennen

ließ. Im Gegensatz dazu hemmen aber Mn^{++}-ionen die hydroly= tische Spaltung von Nicotinsäureamid. Der Zusatz von 1 µMol $MnCl_2$ zur Reaktionslösung bewirkt einen Aktivitäts-Abfall um 53%. Dies steht im Gegensatz zu den von Y. OKA (1954) beschrie= benen Befunden, nach denen die Desamidase-Aktivität einer Bier= hefe durch $MnCl_2$ nicht gehemmt wird.

Tabelle 12: E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s : Aceton= pulver-Extrakt; Einfluß von $MgCl_2$, $MnCl_2$, EDTA, α,α'-Dipyridyl und 8-Hydroxy-chinolin auf die Nicotinsäureamid-desamidase-Wir= kung. Analysenanordnung: o,5 ml Acetonpulver-Extrakt, 1o µMol Nicotinsäureamid, 1 bzw. 5 µMol der jeweilig untersuchten Ver= bindung, Phosphatpuffer (o,o5 molare Endkonzentration, pH-Wert 7,8), 1 ml Gesamtvolumen; 2 h bei 3o°C.

Zugesetzte Verbindungen	Konzen= tration	Titrierwerte (o,o1 n HCl) µl	Protein-Gehalt µg	Spez.Aktivität (µMol NH_3/mg Protein/1 h)
$MgCl_2$	0	o,o39	8oo	o,244
	1 µMol	o,o37		o,231
$MnCl_2$	0	o,o51	925	o,286
	1 µMol	o,o27		o,146
EDTA	0	o,o37	68o	o,272
	5 µMol	o,o3o		o,221
α,α'-Dipyridyl	0	o,o43	765	o,281
	5 µMol	o,o56		o,366
8-Hydroxy-chi= nolin	0	o,o41	925	o,221
	5 µMol	o,o55		o,297

Die Untersuchungen über die Wirkung von Komplexbildnern auf die Desamidase-Wirkung hat unterschiedliche Ergebnisse gezeigt (Tab. 12). Während durch Aethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Zusatz (5 µMol) eine Aktivitätsminderung um 25 bis 35% erhalten wurde, steigt die Aktivität in Gegenwart von jeweils 5 µMol α,α'-Di=

pyridyl oder 8-Hydroxy-chinolin auf 13o% bzw. 134% an. Eine Hemmung der Desamidase-Aktivität um 25% durch EDTA ist u.a. auch von K.V. RAJAGOPALAN u. Mitarb. (196o) beschrieben worden, eine Aktivitäts-Steigerung hingegen durch die beiden anderen Komplexbildner findet sich unseres Wissens nach für eine Nicotinsäureamid-desamidase nicht in der Literatur beschrieben. Zwar haben die zuvor genannten Autoren für die S a c c h a r o m y c e s -Desamidase auf Zusatz von α,α'-Dipyridyl eine Steigerung um 6% beobachtet, doch darf diese sicher nicht als deutliche Aktivierung angesehen werden.

Bei den Versuchen zur Reversibilität der EDTA-Hemmung konnte durch Zusatz von Fe^{++}-ionen keine Veränderung der Hemmwirkung festgestellt werden. Nach Zugabe von Mg^{++}- und Mn^{++}-ionen wird die Hemmung teilweise wieder aufgehoben (zu etwa 5o%). Dies ist ein Hinweis, daß wahrscheinlich Metall-ionen für die Desamidase-Wirkung benötigt werden.

In Gegenwart von Cu^{++}- oder Co^{++}-ionen (2,5 µMol/ml Reaktionslösung) ist die Desamidase-Aktivität um ca. 1o% gehemmt. Diese geringe Aktivitätsminderung deutet nicht auf eine spezifische Hemmung durch Reaktion der Metall-ionen mit aktiven SH-Gruppen des Enzyms hin. Daraus wird geschlossen, daß bei der Wirkung der Nicotinsäureamid-desamidase von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s im Gegensatz zur T o r u l o p s i s -Desamidase (siehe weiter unten) keine SH-Gruppen beteiligt sind. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der E n d o m y c o p s i s -Desamidase scheinen nur mit hochgereinigten Enzymextrakten sinnvoll zu sein, da wegen der geringen spezifischen Aktivität und der großen Wärmeempfindlichkeit eine Beeinflus-

sung der Enzymwirksamkeit quantitativ schwer faßbar ist.

2. Die Nicotinsäureamid-desamidase von T o r u l o p s i s u t i l i s

a) Nachweis und spezifische Aktivität der Desamidase im Aceton=pulver-Extrakt [7])

Wie bei den Untersuchungen mit Suspensionen durch Chloroform abgetöteter Zellen (H. KATING, 1959), so zeigte sich auch mit Suspensionen von Acetontrockenpulvern in Phosphat-Puffer-Lösung (1 h bei 37°C; vgl. S.8o), daß T o r u l o p s i s u t i = l i s Nicotinsäureamid erheblich stärker hydrolytisch spaltet als E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s . Die durch diese Suspensionen freigesetzten NH_3-Mengen waren mehr als zehnfach so hoch und auch ein chromatographischer Nicotinsäure-Nachweis in der Inkubationslösung war wesentlich intensiver als bei E n d o m y c o p s i s . - Da H. KATING weiterhin zeigen konn=te, daß diese Desamidase-Wirkung bei den abgetöteten Zellen über einen sehr weiten pH-Bereich hinweg (5,o bis 1o,o) mit fast unverminderter Stärke auftritt, sollte zunächst das pH-Optimum für die Untersuchungen in z e l l f r e i e n E x = t r a k t e n bestimmt werden.

Analysenanordnung: In parallelen Ansätzen wurden o,5 ml Sus=pension mit 1o µMol Nicotinsäureamid in den in Abb.26 angegebe=nen Pufferlösungen 1 h lang bei 37°C inkubiert. Die NH_3-Bestim=mung erfolgte nach dem auf S.21 beschriebenen Verfahren, wobei zwei weitere Parallelansätze zur Blindwertbestimmung mitgeführt

[7]) Auch im extrahierten Acetonpulver von T o r u l o p s i s war - wie bei E n d o m y c o p s i s -noch eine auffallend hohe Desamidase-Aktivität nachweisbar. Da aber die Zellen im Acetonpulver ebenfalls nicht vollständig zerstört vorlagen (ca. 5o%), kann unter diesen Bedingungen die Frage, ob neben dem lös=lichen auch ein strukturgebundenes Enzym vorliegt, nicht ge=klärt werden.

wurden, die a) den gepufferten Extrakt und b) das Substrat allein enthielten. Der Protein-Gehalt der Extrakte wurde nach der von D.H. LOWRY u. Mitarb. (1951; siehe S. 124) beschriebenen Methode bestimmt. - Die spezifische Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase von T o r u l o p s i s u t i l i s wird angegeben in µMol NH_3, die in 1 h bei 37° C von 1 mg Protein freigesetzt werden.

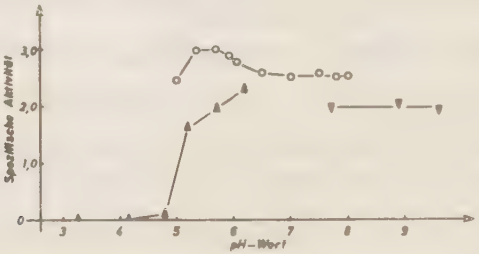


Abbildung 26: T o r u l o p s i s u t i l i s : Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase vom pH-Wert und dem Puffersystem der Reaktionslösung. △——△ = McIlvaine-Puffer, ○——○ = Phosphat-Puffer, ▽——▽ = Tris-Acetat-Puffer. Mittelwerte aus je zwei Parallelansätzen.

Die Nicotinsäureamid-desamidase von T o r u l o p s i s u t i l i s weist im Gegensatz zur E n d o m y c o p s i s -desamidase ein völlig anderes Verhalten auf. Während für E n d o m y c o p s i s das pH-Optimum mit 7,8 in Phosphat-Puffer bestimmt werden konnte (Abb.22), zeigt dieses Enzym unter gleichen Bedingungen im pH-Bereich von 5,3 bis 5,7 die höchste Aktivität (siehe Abb.26). Bei einer kurzen Verschiebung des pH-Wertes nach 5,o fällt die Aktivität jedoch steil ab. Obwohl die enzymatische Aktivität in McIlvaine-Pufferlösung (pH-Bereich 3,2 bis 6,2) wesentlich hinter der mit Phosphat gepufferten zurückbleibt, ist dennoch zu erkennen, daß die Aktivität bei einer weiteren pH-Verschiebung in den sauren Bereich sehr schnell erlischt. Dagegen bleibt sie nach kurzem Abfall bei einer Verschiebung in den alkalischen pH-Bereich zwischen 6,5 und 8,o unverändert erhalten. - In Tris-Acetat-Pufferlösung ist

die enzymatische Wirkung der Desamidase gleichfalls wie in McIlvaine-Pufferlösungen gegenüber dem Phosphat-Puffer gehemmt [8]. Es ist jedoch auch in dieser Pufferlösung eine gleich hohe Aktivität über einen größeren pH-Bereich hinweg (7,7 bis 9,6) nachweisbar. Hier kommt ein weiterer Unterschied zur E n d o m y c o p s i s -Desamidase zum Ausdruck. Einmal war die Aktivität dieses Enzyms in mit Tris-Acetat gepufferten Medien höher (beachte die Vorbehalte, S. 78) als in Phosphat-Pufferlösungen und zum anderen wurde sie mit steigendem pH-Wert stetig geringer. - Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die weiteren Untersuchungen mit zellfreien Extrakten in Phosphat-Pufferlösung (pH-Wert 5,8) durchgeführt.

Zunächst wurde unter diesen Bedingungen die enzymatische Hydrolyse von Nicotinsäureamid in Abhängigkeit von der Inkubations-

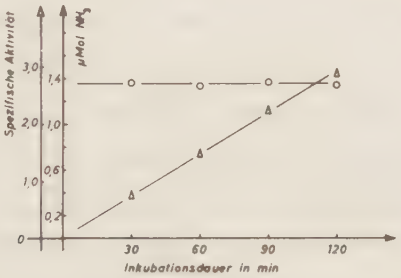


Abbildung 27: T o r u l o p s i s u t i l i s : Abhängigkeit der enzymatisch gebildeten Nicotinsäure-Menge von der Inkubationsdauer. Δ—— Δ = µMol NH_3 pro Ansatz, O—— O = spezifische Aktivität (µMol NH_3/mg Protein/6o min 37° C). Mittelwerte aus je zwei Parallelansätzen.

[8] Bei den Untersuchungen im alkalischen pH-Bereich wurden die Reaktionen in geschlossenen Conway-Schalen im Brutschrank bei 37° C durchgeführt. Die angegebenen Werte sind die Differenz der Werte, die nach 2o min und nach 8o min Gesamt-Reaktionsdauer gemessen wurden.

dauer geprüft: Werden die bei der NH_3-Bestimmung erhaltenen Titrierwerte als Funktion der Zeit in einem Diagramm aufgetragen (Abb.27), so entsteht eine Gerade. Es zeigt sich bei einer Berechnung der spezifischen Aktivität, daß für jeden Zeitpunkt der Inkubationsdauer die gleichen Werte um 2,7 µMol NH_3 erhalten werden.

Bei einer Untersuchung der enzymatischen Hydrolyse als Funktion der eingesetzten Extraktmenge (= Protein-Gehalt) wurden bei gleicher Reaktionsdauer sehr ähnliche Ergebnisse erhalten: Die in einem Diagramm in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration aufgetragenen NH_3-Werte ergaben eine Gerade, und auch bei einer Berechnung der spezifischen Aktivität resultierten jeweils die gleichen Werte. - In einem Vergleich der spezifischen Aktivitäten (beachte jedoch die unterschiedlichen Definitionen!) beider Versuchsorganismen bestätigen die erhaltenen Ergebnisse die oben genannten Befunde, daß T o r u l o p s i s u t i l i s eine mehr als zehnmal stärkere Desamidase-Wirksamkeit besitzt als die Fetthefe E n d o m y c o p s i s . Weiterhin konnte bei den Untersuchungen des T o r u l o p s i s -Enzyms kein Aktivitätsabfall mit zunehmender Inkubationsdauer beobachtet werden. Das deutet auf eine größere Stabilität dieses Enzyms hin, die sich auch darin äußert, daß ein 8 Wochen lang bei ± 0 bis 2°C trocken gelagertes Acetonpulver nur einen Aktivitätsverlust von 25% zeigte.

b) Einfluß der Temperatur auf die Desamidase-Aktivität

Wie in Abb.28 gezeigt wird, steigt die Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase von T o r u l o p s i s u t i l i s mit zunehmender Temperatur zwischen 10° und 57°C sehr stark an,

fällt aber dann bei einer Temperatur von 65°C steil ab. Bei 7o°C konnte unter diesen Bedingungen keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Eine Behandlung des Extraktes über 3 min in kochendem Wasserbad inaktiviert die Desamidase vollständig. - Auch in diesen Eigenschaften unterscheidet sich demnach das Enzym von der E n d o m y c o p s i s -Desamidase, die eine sehr viel höhere Wärmeempfindlichkeit zeigte, ihr Temperaturoptimum bei 33°C hatte und bereits bei einer Temperatur von 52° bis 55°C vollständig denaturiert wurde.

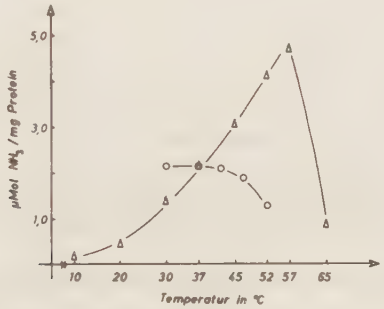


Abbildung 28: T o r u l o p s i s u t i l i s : Einfluß der Temperatur auf die Nicotinsäureamid-desamidase-Wirkung. Δ——Δ = µMol NH_3 (berechnet auf 1 mg Protein) nach 1 h Inkubation bei angegebener Temperatur, o——o = µMol NH_3; 3o min Präinkubation bei angegebener Temperatur, danach Inkubation mit dem Substrat 1 h bei 37°C. Mittelwerte aus je zwei Parallelansätzen.

Die Abhängigkeit der Enzymstabilität von der Temperatur kann weiterhin durch die zusätzlich in Abb.28 eingetragenen Ergebnisse veranschaulicht werden. Es hat sich gezeigt, daß nach einer Vorbehandlung der Extrakte über 15 min bei den angegebenen Temperaturen bereits zwischen 42° und 45°C eine nachweisbare Inaktivierung beginnt, die dann bei 52°C schon 4o% beträgt. Da bei 3o° und 37°C diese Aktivitätsverluste nicht nachweisbar waren, sind alle weiteren Untersuchungen bei 37°C durchgeführt worden.

c) Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Kulturdauer

Im Folgenden sollte geprüft werden, ob sich auch - wie bei der E n d o m y c o p s i s -Kultur - die spezifische Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase von T o r u l o p s i s im Verlauf der Kulturdauer ändert. Wie in Abb.29 dargestellt ist, haben junge T o r u l o p s i s -Kulturen (62 h) mit o,6 µMol NH_3 eine niedrige spezifische Aktivität. Mit fortschreitendem

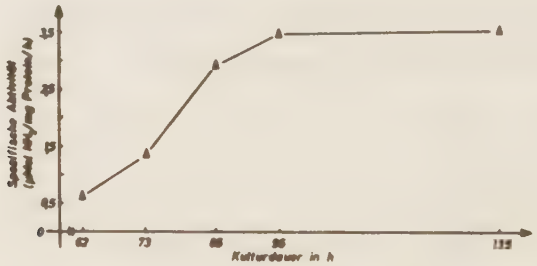


Abbildung 29: T o r u l o p s i s u t i l i s : Spezifische Aktivität der Nicotinsäureamid-desamidase in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Mittelwerte aus je zwei Parallelansätzen.

Kulturalter steigt diese aber dann sehr stark an (um das Sechsfache) und erreicht nach 96 Kulturstunden einen Wert von 3,5 µMol, der auch nach 135 Kulturstunden noch gemessen wurde. Hieraus kann abgeleitet werden, daß - ebenso wie bei E n d o m y c o p s i s - durch den hohen Stoffwechsel in der stark wachsenden Kultur eine starke Enzym-Synthese einsetzt, die erst dann zum Stillstand kommt, wenn sich das Substrat in der Nährlösung erschöpft. Entgegen den Befunden bei E n d o m y c o p s i s kann bei diesem Organismus jedoch beobachtet werden, daß der einmal erreichte Enzymspiegel dann auch in ruhenden Kulturen nicht sinkt, sondern über längere Zeit erhalten bleibt.

236 µg nach 48 h und 397 µg nach 124 h Kulturdauer. - Die weiter oben angeführten Befunde anderer Untersucher zeigen, daß bei Verwendung verschiedener T o r u l o p s i s -Stämme und unterschiedlicher Kulturbedingungen der Nicotinsäure-Gehalt in der Trockensubstanz wesentlich höher sein kann.

2. Der Einfluß der N-Konzentration in der Nährlösung auf die Nicotinsäure-Bildung in Oberflächenkulturen von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p s i s u t i l i s

Bei E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s , die auf 1% Asparagin als alleiniger N-Quelle in der Nährlösung gezogen wurde, liegt eine Parallelität zwischen der N-Assimilation und der Nicotinsäure-Synthese vor (siehe Tab.5). T o r u l o p s i s u t i l i s hingegen bildet noch erhebliche Mengen Nicotinsäure bei sich erschöpfendem Nährsubstrat (siehe Tab.6). Auf 1 g Trockensubstanz bezogen nimmt mit steigender Kulturdauer bei E n d o m y c o p s i s der Nicotinsäure-Gehalt ab, bei T o r u l o p s i s hingegen erfolgt trotz Verminderung der N-Konzentration der Nährlösung eine stetige Zunahme. Um die Beziehungen zwischen der N-Konzentration in einer Nährlösung und dem Nicotinsäure-Bildungsvermögen beider Pilze näher kennenzulernen, sollte mit den folgenden Versuchsreihen der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt von N-Mangel-Kulturen[4]) untersucht werden.

Versuchsanordnung: Die Organismen wurden als Oberflächen-Kulturen auf Wöltje-Nährlösung mit vermindertem Asparagin-Gehalt gezogen. Für die E n d o m y c o p s i s -Kultur enthielt die

[4]) Während E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s auf 1/4% Asparagin-N in der Nährlösung ein noch ausreichendes Wachstum zeigt (S. HEIDE, 1939; H. KATING, 1955b), vermag sich T o r u l o p s i s u t i l i s bei dieser N-Konzentration kaum noch zu entwickeln. Für letzten Organismus sind o,5% Asparagin in der Wöltje-Nährlösung bereits N-Mangelbedingungen (H. RAAF, 194[illegible]).

Nicotinsäureamid nicht. Ein Zusatz von 5 µMol p-CMB jedoch hemmt die Desamidase-Wirkung fast vollständig. Es kann daraus geschlossen werden, daß wahrscheinlich die Desamidase SH-Gruppen besitzt, die für die hydrolytische Aktivität verantwortlich sind.

Zur weiteren Untersuchung dieser Befunde sollte nun mit steigenden p-CMB-Konzentrationen eine Hemmkurve für die Desamidase-Aktivität aufgestellt und ihre Reversibilität durch Zusatz von Cystein geprüft werden. Die Ergebnisse sind in Abb.3o graphisch dargestellt worden. Die Hemmung der Desamidase-Wirksamkeit durch p-CMB beträgt bei einem Zusatz von $4 \cdot 1o^{-2}$ µMol pro 1 ml Reaktionslösung ca. 4o% gegenüber der Kontrolle ohne p-CMB-Zusatz. Bei einer Konzentration von $1 \cdot 1o^{-1}$ µMol p-CMB pro 1 ml ist die Desamidase-Aktivität zu 95% und ab $1,3 \cdot 1o^{-1}$ µMol pro ml ist sie vollständig gehemmt. Die totale Hemmung der enzymatischen Hydrolyse von Nicotinsäureamid durch $4 \cdot 1o^{-1}$ µMol p-CMB wird durch 5 µMol L-Cystein-Zusatz gänzlich wieder aufgehoben. Diese Befunde unterstützen weiterhin die Vermutung, daß eine oder mehrere SH-Gruppen im Desamidase-Molekül an der Nicotinsäureamid-Hydrolyse beteiligt sind.

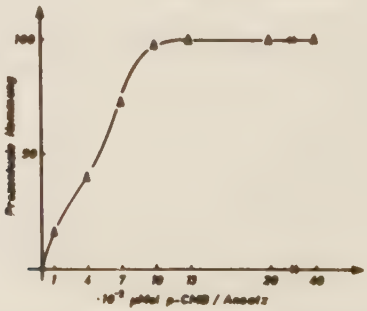


Abbildung 3o: T o r u l o p s i s u t i l i s : Hemmung der Nicotinsäureamid-desamidase-Aktivität durch p-CMB. Mittelwerte aus je zwei Parallelansätzen.

α,α'-Dipyridyl und Aethylendiamintetraessigsäure (EDTA): Bei den Voruntersuchungen zur hydrolytischen Spaltung von Nicotinsäureamid durch Acetonpulver-Extrakte hatte sich - ebenso wie bei Endomycopsis - ein Zusatz von 5 µMol $MgCl_2$ (zusammen mit ATP) zur Reaktionslösung ohne Einfluß auf die Desamidase-Wirkung erwiesen. Entgegen den entsprechenden Befunden bei Endomycopsis jedoch wirkte sich ein Zusatz von EDTA (5 µMol) nicht hemmend auf die Desamidase-Aktivität aus, wohl aber ein solcher von 1 µMol α,α'-Dipyridyl (ca. 4o% Hemmung). In Abb.31 ist eine Hemmkurve wiedergegeben, die mit Konzentrationen zwischen 0 und 8,25 µMol α,α'-Dipyridyl erhalten wurde. Danach ist die Nicotinsäureamid-desamidase in Acetonpulverextrakten bei einem Zusatz von 2,75 µMol α,α'-Dipyridyl/ml Reaktionslösung um 7o% gehemmt. Ein Zusatz von 8,25 µMol dieser Substanz läßt dann jedoch keinen wesentlichen Aktivitätsabfall mehr erkennen.

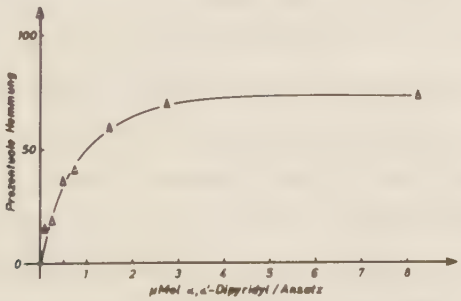


Abbildung 31: Torulopsis utilis: Hemmung der Nicotinsäureamid-desamidase-Aktivität durch α,α'-Dipyridyl beim pH-Wert 5,7. Mittelwerte aus je zwei Parallelansätzen.

Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, daß offensichtlich für die Aktivität auch dieses Enzyms bi- oder tri-valente

Metall-ionen notwendig sind, wie dies für die entsprechenden Desamidasen einer Reihe von Organismen (K.V. RAJAGOPALAN u. Mitarb., 1960) wahrscheinlich gemacht wurde. Ob auch mit diesem Komplexbildner eine totale Aktivitäts-Hemmung erreicht werden kann, müßte mit enzymangereicherten Präparaten näher untersucht werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen über die Nicotinsäureamid-desamidase-Wirkung der beiden Versuchsorganismen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: E n d o m y c o p s i s und T o r u l o p s i s besitzen Enzymsysteme zur hydrolytischen Spaltung von Nicotinsäureamid, deren spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Kulturdauer mit unterschiedlichen Werten bestimmt wurden. Die zu der Gruppe der Acylamid-desamidasen (EC 3.5.1.4) zu zählenden Enzyme sind jedoch unterschiedlicher Natur. Die E n d o m y c o p s i s -Desamidase besitzt ein pH-Optimum um 7,8 (Phosphat-Puffer), ist wärmeempfindlich, hat ein Temperaturoptimum bei 33° C und denaturiert bei 52° C; bei ihrer hydrolytischen Wirkung sind anscheinend keine SH-Gruppen beteiligt, wahrscheinlich werden aber Metall-ionen benötigt. Die T o r u l o p s i s -Desamidase hingegen ist über einen weiten pH-Bereich hinweg (5,0 bis 9,6; Phosphat- und Tris-Puffer) mit einem schwach ausgeprägten Optimum um den pH-Wert 5,5 aktiv, sie ist weniger wärmeempfindlich als das vorgenannte Enzym und denaturiert erst zwischen 65° und 70° C; die aktive Desamidase benötigt ebenfalls Metall-ionen wie bei E n d o m y c o p s i s, besitzt hingegen aber für die Wirksamkeit erforderliche SH-Gruppen.

3. Diskussion über die Nicotinsäureamid-desamidasen von E n = d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p = s i s u t i l i s

H. KATING berichtete 1959, daß die durch Chloroform abgetöte= ten Zellen von E n d o m y c o p s i s und T o r u l o p = s i s in Nicotinsäureamid-Lösungen NH_3 freisetzen, wobei T o = r u l o p s i s unter den gleichen Bedingungen eine sehr viel größere NH_3-Menge bildet als E n d o m y c o p s i s . Ähnli= che Ergebnisse wurden auch bei den weiteren Untersuchungen von H. KATING u. G. DREPHAL (1966) erhalten. Nicotinsäureamid wird von den lebenden Zellen beider Organismen aufgenommen, aber es wird in den E n d o m y c o p s i s -Zellen nur in Spuren zu Nicotinsäure und NH_3 gespalten, während in den T o r u l o p = s i s -Zellen große Nicotinsäure-Mengen und nur wenig Nicotin= säureamid nachweisbar waren. Die daraufhin ausgesprochenen Ver= mutungen über eine sehr unterschiedliche Nicotinsäureamid-des= amidase-Aktivität bei beiden Organismen können durch die hier vorliegenden Untersuchungen mit zellfreien Extrakten von Ace= tonpulvern bestätigt werden. T o r u l o p s i s u t i l i s besitzt eine mehr als zehnfach höhere Desamidase-Aktivität als E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s . Diese Befunde stehen in Parallelität zu den Ergebnissen der Untersuchungen über den Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt dieser Pilze (siehe Abb.5 und 6,S.4o). Danach hat die Eiweißhefe T o r u l o p s i s gegenüber der fettbildenden Hefe einen größeren Bedarf an Nicotinsäure. Wenn für T o r u l o p s i s u t i l i s nun auch eine höher akti= ve Nicotinsäureamid-desamidase nachgewiesen wurde, die - wenn in der Zelle vorhanden - am NAD-Abbau beteiligt ist und die -

wichtiger noch - die Rückgewinnung des durch den Abbau anfallenden Nicotinsäureamids für die Resynthese zu NAD ermöglicht, kann angenommen werden, daß bei dieser Hefe ein aktiver Pyridinnucleotid-Stoffwechsel wie auch ein höherer Pyridinnucleotid-Bedarf vorliegt als bei E n d o m y c o p s i s .

Aus dem Vorhandensein einer Nicotinsäureamid-desamidase in den beiden Versuchsorganismen wird abgeleitet, daß sowohl in T o r u l o p s i s als auch in E n d o m y c o p s i s der Pyridinnucleotid-Cyclus realisiert ist, d.h. daß die frei in den Zellen auftretende (aus dem NAD- oder NADP-Abbau stammende) Nicotinsäure über den PREISS-HANDLER-Stoffwechselweg von den Versuchsorganismen wieder zur Pyridinnucleotid-Synthese genutzt werden kann (J. PREISS u. P. HANDLER, 1958a, b).

B. PETRACK u. Mitarb. (1963) sehen die Desamidierung von Nicotinsäureamid in der Säugetier-Leber als den ersten und den das Ausmaß begrenzenden Schritt in der NAD-Synthese aus Nicotinsäureamid an. Das Vorhandensein eines solchen Regulationssystems bei E n d o m y c o p s i s wäre denkbar, da nach externer Zufuhr von Nicotinsäureamid in den Zellen neben größeren Mengen des freien Amids nur Spuren von freier Nicotinsäure gefunden wurden (die gebildete Nicotinsäure wird sofort in den Pyridinnucleotid-Cyclus eingeschleust). Jedoch ist diese Annahme sicher nicht generell möglich, da im Gegensatz zur Fetthefe bei T o r u l o p s i s große Mengen freier Nicotinsäure in den Zellen nachgewiesen werden konnten (H. KATING u. G. DREPHAL, 1966). - Es bleibt zu klären, ob diese Befunde, daß Nicotinsäureamid bei beiden Organismen und Nicotinsäure nur bei E n d o m y c o p s i s ab einer bestimmten Konzentration in der

Nährlösung das Wachstum hemmt, auf eine Hemmung des Pyridin=nucleotid-Cyclus durch Substratüberschuß und mithin auf eine Hemmung des NAD-Stoffwechsels überhaupt zurückgeführt werden können oder ob sie - wie P. FEIGELSON u. Mitarb. (1951) fanden - auf einer kompetitiven Hemmung der NAD als Coenzym benötigenden Apoenzyme beruhen (siehe auch D.S.R. SARMA u. Mitarb., 1962).

Bei einem Vergleich der Untersuchungen zur Desamidase-Wirkung von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p s i s u t i l i s wird deutlich, daß es sich hier um zwei unterschiedliche Enzymsysteme handelt. Dies äußert sich in den verschiedenen pH-Optimums-Kurven, der unterschiedlichen Temperaturempfindlichkeit und dem andersartigen Verhalten gegenüber chemischen Agentien. Ein direkter Vergleich dieser Enzyme untereinander sowie mit anderen in der Literatur beschriebenen ist jedoch erst nach weiteren Untersuchungen mit angereicherten oder gereinigten Desamidase-Präparaten möglich, zumal J. KIRCHNER u. Mitarb. (1966) berichteten, daß für die Nicotinsäureamid-desamidase aus Lebermikrosomen nach einer Anreicherung ein anderer V_{max}-Wert bestimmt wurde und daß das pH-Optimum um einen ganzen Wert verschoben war gegenüber dem von ungereinigten Präparaten.

VI. ZUR PHYSIOLOGISCHEN WIRKUNG VON NICOTINSÄURE UND NICOTINSÄUREAMID BEI *ENDOMYCOPSIS VERNALIS* UND *TORULOPSIS UTILIS*

H. KATING (1959) berichtete, daß *Endomycopsis vernalis* und *Torulopsis utilis* auf Nicotinsäureamid als einziger N-Quelle nicht zu wachsen vermögen. Es sollte deshalb versucht werden, Hinweise über die physiologische Wirkung von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid bei diesen Organismen zu erhalten.

Eine wuchsfördernde Wirkung durch kleine Nicotinsäure-Mengen (zusätzlich zur N-Quelle) haben u.a. E.N. MAKAROVA und S.P. OGANESYAN (1963) bei mehreren *Candida*-Arten beobachtet (siehe auch M.I. GORYAYEW u. Mitarb., 1967). Eine toxische Wirkung durch Nicotinsäure ist dagegen u.a. für *Neurospora crassa* (H. AURICH u. D. MÜCKE, 1959) oder *Colletotrichum capsici* (A.P. MISRA u. M. MAHMOOD, 1961) beziehungsweise durch Nicotinsäureamid auch für *Aspergillus niger* (D.S.R. SARMA u. Mitarb., 1962) beschrieben worden. - Ziel der Untersuchungen war es deshalb,

a) mit abgestuften Konzentrationen dieser Pyridinderivate als Zusatz zur vollständigen Nährlösung den Einfluß auf das Wachstum von *Endomycopsis* und *Torulopsis* zu prüfen und

b) festzustellen, welche Zellkomponenten vornehmlich durch den Einfluß betroffen werden.

1. Der Einfluß von Nicotinsäure- und Nicotinsäureamid auf das Wachstum von *Endomycopsis* und *Torulopsis*

Versuchsanordnung: Der Wöltje-Nährlösung mit 1% Ammonium-suc=

cinat als N-Quelle wurden die in Tab.14 angegebenen Konzentrationen von Nicotinsäure beziehungsweise Nicotinsäureamid zugesetzt. Die Kulturschalen wurden mit o,5 ml einer dünnen Zellsuspension beimpft. Die Versuchsorganismen wurden nach 4 Tagen Kulturdauer geerntet.

Die Ergebnisse sind in Tab.1 zusammengestellt worden. N i c o t i n s ä u r e - Z u s a t z von $2 \cdot 10^{-4}$ mMol in 1 ml Nährlösung ermöglicht E n d o m y c o p s i s noch eine normale Entwicklung; $5 \cdot 10^{-4}$ mMol/ml hingegen hemmen die Trockensubstanzbildung gegenüber der Kontrolle ohne Zusatz um rund 11%. Mit steigenden Nicotinsäure-Mengen verstärkt sich die Hemmung. Bei $1 \cdot 10^{-2}$ mMol Nicotinsäure/ml kommt die Animpfung nicht mehr zur Entwicklung. - Nach H. AURICH u. D. MÜCKE (1959)

Tabelle 14 Trockensubstanzbildung von E n d o m y c o p s i s und T o r u l o p s i s auf Ammoniumsuccinat als N-Quelle bei Zusatz von Nicotinsäure bzw. Nicotinsäureamid. Mittelwerte von je 3 Kulturschalen

Nicotinsäure mMol/ml	Trockengew.(mg) Endom.	Torul.	Nicotinsäureamid mMol/ml	Trockengew.(mg) Endom.	Torul.
0,0	322,1	416,2	0,0	34o,1	427,1
$2 \cdot 10^{-4}$	325,6	419,o	2.10^{-4}	328,6	42o,4
$5 \cdot 10^{-4}$	288,2	438,3	5.10^{-4}	2o4,1	481,2
1.10^{-3}	174,2	478,6	$1 \cdot 10^{-3}$	0,0	522,o
$2 \cdot 10^{-3}$	166,2	478,2	2.10^{-3}	0,0	543,o
$5 \cdot 10^{-3}$	162,1	483,o	$5 \cdot 10^{-3}$	0,0	437,9
$1 \cdot 10^{-2}$	0,0	423,2	$1 \cdot 10^{-2}$	0,0	324,8
$2 \cdot 10^{-2}$	0,0	413,9	$2 \cdot 10^{-2}$	0,0	89,8
$4 \cdot 10^{-2}$	0,0	434,8	$4 \cdot 10^{-2}$	0,0	0,0
$8 \cdot 10^{-2}$	0,0	42o,6	$8 \cdot 10^{-2}$	0,0	0,0
$1 \cdot 10^{-1}$	0,0	424,3	$1 \cdot 10^{-1}$	0,0	0,0

vermag N e u r o s p o r a c r a s s a u.a. bei einer Konzentration von $7,2 \cdot 10^{-2}$ mMol Nicotinsäure/ml Nährlösung nicht mehr zu wachsen. Da jedoch das Wachstum nur bei dieser Konzen=

tration getestet wurde, ist es wahrscheinlich, daß auch für diesen Organismus eine ähnliche Toxizitäts-grenze wie für E n d o m y c o p s i s aufgestellt werden kann.

T o r u l o p s i s wird durch die gleichen Nicotinsäure-Zusätze nicht gehemmt. Konzentrationen von $1 \cdot 1o^{-3}$ m Mol/ml bewirken sogar eine Steigerung der Trockensubstanzbildung um rund 15%. Damit ist auch dieser T o r u l o p s i s -Stamm durch eine geringe wuchsfördernde Wirkung durch Nicotinsäure ausgezeichnet wie es von E.N. MAKAROVA u. S.P. OGANESYAN (1963) für acht C a n d i d a -Arten festgestellt worden ist.

N i c o t i n s ä u r e a m i d - Z u s a t z hemmt das Wachstum von E n d o m y c o p s i s stärker als Nicotinsäure: $5 \cdot 1o^{-4}$ mMol in 1 ml der Nährlösung mindern die Trockensubstanzbildung von E n d o m y c o p s i s auf 6o% gegenüber der Kultur ohne Zusatz. Bereits die doppelte Konzentration ($1 \cdot 1o^{-3}$ mMol/ml) läßt die Beimpfung nicht mehr zur Entwicklung kommen,- Auch das Wachstum von T o r u l o p s i s wird durch Nicotinsäureamid (im Gegensatz zu den Ansätzen mit Nicotinsäure) gehemmt. Allerdings sind größere Konzentrationen von Nicotinsäureamid als bei E n d o m y c o p s i s zu vergleichbaren Wachstumshemmungen nötig. Erst $4 \cdot 1o^{-2}$ mMol/ml unterbinden die Entwicklung der Kultur vollständig.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von SARMA u. Mitarb. (1962) an A s p e r g i l l u s n i g e r gewonnenen überein. Für eine gleich starke Wachstumshemmung wird bei A. n i g e r an Nicotinsäureamid nur 1/5 der Konzentration von Nicotinsäure benötigt.

2. Untersuchungen zur Verwertung von Nicotinsäure und Nicotinsäureamid durch E n d o m y c o p s i s und T o r u l o p s i s

Die in Tab.14 wiedergegebenen Analysen zeigen, daß Nicotinsäureamid das Wachstum stärker hemmt als die Säure. Nicotinsäure ist bei T o r u l o p s i s sogar ohne Wirkung. Es lag deshalb nahe zu prüfen, ob die geringere Empfindlichkeit von T o r u l o p s i s gegenüber Nicotinsäureamid (im Vergleich zu E n d o m y c o p s i s) auf eine auch in vivo starke Desamidase-Wirksamkeit (siehe hierzu die in vitro-Untersuchungen, S. 9o) zurückzuführen ist.

Versuchsanordnung: E n d o m y c o p s i s und T o r u l o p s i s wurden auf Wöltje-Lösung vorgezogen und dann auf Nährlösungen umgepflanzt, die in 1 ml 8 · $1o^{-5}$ mMol Nicotinsäure oder Nicotinsäureamid enthielten. Zu bestimmten Zeiten wurden die Kulturen geerntet, zentrifugiert und gründlich gewaschen. Das Zellmaterial wurde sofort mit Kieselgur im Achatmörser zerrieben und mit Wasser extrahiert. Der Extrakt wurde zur Trockne eingeengt und mit 3 ml Wasser wieder aufgenommen. 5o µl dieser Lösung wurden zur papierchromatographischen Analyse auf Nicotinsäure und Nicotinsäureamid verwandt (siehe Analysenmethoden, S. 14).

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind zusammengefaßt folgende: Nicotinsäure und das Amid dringen bei beiden Organismen in die Zelle ein. Während das Nicotinsäureamid in den E n d o m y c o p s i s -Zellen nur in Spuren desamidiert wird, bewirkt die höher aktive Nicotinsäureamid-desamidase in den T o r u l o p s i s -Zellen einen schnellen Abbau des Substrates. Bereits 4 h nach der Umpflanzung sind nur Spuren von Nicotinsäureamid, jedoch große Mengen von Nicotinsäure im Zellextrakt papierchromatographisch nachweisbar.

Wahrscheinlich ist die recht wirksame Nicotinsäureamid-desamidase dafür verantwortlich, daß das Wachstum von T o r u =

l o p s i s erst durch höhere Konzentrationen des Substrates gehemmt wird. Nicotinsäureamid wird zu einem großen Teil durch Spaltung in die bei T o r u l o p s i s nicht hemmende Ni= cotinsäure umgewandelt (vgl. Tab.14).

3. Trockensubstanzproduktion, Gesamt-N und Ätherlösliches in Umpflanzkulturen auf Nicotinsäureamid

Es interessierte weiterhin, welche Zellkomponenten durch die durch Nicotinsäureamid hervorgerufene Hemmung betroffen wer= den.

Versuchsanordnung: Die Versuchsorganismen wurden 3 1/2 Tage auf Wöltje-Nährlösung mit 1% Ammoniumsuccinat als N-Quelle vorgezogen und dann auf Nährlösungen ohne N-Quelle (Kontrol= le) oder mit den in der Tab.15 angegebenen Nicotinsäureamid-Konzentrationen als alleinigem N-Donator umgepflanzt. Die Ernte erfolgte 16 und 28 h nach der Umpflanzung. - Der Gesamt-N der Trockensubstanz wurde nach dem Mikro-Kjeldahl-Verfahren (siehe S.122), der Fettgehalt (= "Ätherlösliches") durch Äther= extraktion des mit Kieselgur zerriebenen Trockenpilzes bestimmt. Zur quantitativen NH_3-Bestimmung diente der Ammoniak-Destilla= tionsapparat nach PUCHER, VICKERY u. LEAVENWORTH (siehe T. LAI= NE u. A.J. VIRTANEN, 1941).

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind in Tab.15 wiederge= geben. Bei E n d o m y c o p s i s steigt im Kontrollversuch (ohne N-Quelle) das Trockengewicht von 327,5 mg auf 52o,5 mg (28 h nach der Umpflanzung) an. Im gleichen Zeitraum steigen die Trockengewichte der Ansätze mit Nicotinsäureamid nur auf 445,o bzw. 458,2 mg. Die Analysen des Ätherlöslichen zeigen sowohl absolut als auch prozentual eine Steigerung gegenüber den Wer= ten zum Zeitpunkt der Umpflanzung: von 46,5 mg (14,2%) auf 175,9 mg (33,8%) beim Ansatz ohne Nicotinsäureamid, aber nur auf 87,o mg (19,5%) bei Zusatz von $5 \cdot 1o^{-2}$ mMol Nicotinsäure= amid/ml (28 h nach Umpflanzung). Der Gesamt-N-Gehalt des My= cels hingegen ist praktisch unverändert geblieben.

Tabelle 15: Trockensubstanzproduktion, Gesamt-N und Ätherlösliches in Umpflanzkulturen von Endomycopsis und Torulopsis mit Nicotinsäureamid als N-Quelle. Mittelwerte von je 3 Kulturschalen

Nic.sre.-amid	Endomycopsis vernalis				Torulopsis utilis			
	Trocken=substanz mg	Gesamt-N mg	Ätherl. mg (% vom Tr.-gew.)	NH_4-N in Nährl. mg	Trocken=substanz mg	Gesamt-N mg	Ätherl. mg (% vom Tr.-gew.)	NH_4-N in Nährl. mg
	Kontrolle zum Zeitpunkt der Umpflanzung				Kontrolle zum Zeitpunkt der Umpflanzung			
	327,5	14,3	46,5(14,2%)	0,0	312,o	16,2	28,2(9,o%)	0,0
	16 h nach Umpflanzung				16 h nach Umpflanzung			
0	461,2	14,7	1o1,4(22,o%)	1,84	362,1	16,1	37,3(1o,3%)	0,27
$1 \cdot 1o^{-2}$	434,o	14,8	84,6(19,5%)	1,89	379,o	15,9	32,2(8,5%)	1,2o
$5 \cdot 1o^{-2}$	423,o	14,9	83,8(19,8%)	2,11	384,o	17,9	31,5(8,2%)	7,47
$1 \cdot 1o^{-1}$	432,o	14,6	81,6(18,9%)	2,13	388,7	18,2	33,4(8,6%)	8,52
	28 h nach Umpflanzung				28 h nach Umpflanzung			
0	52o,5	14,6	175,9(33,8%)	o,34	38o,5	15,7	41,5(1o,9%)	o,25
$1 \cdot 1o^{-2}$	458,2	14,8	94,1(19,1%)	1,o9	358,o	16,7	3o,o(8,3%)	o,73
$5 \cdot 1o^{-2}$	446,2	14,7	87,o(19,5%)	2,41	4o5,4	19,6	33,6(8,3%)	8,12
$1 \cdot 1o^{-1}$	445,o	14,9	86,3(19,4%)	2,33	411,8	2o,9	35,2(8,5%)	18,95

Die Analysen zeigen, daß E n d o m y c o p s i s den Amid-N des Nicotinsäureamids nicht zur Eiweißsynthese nutzt (siehe Analysenwerte "Gesamt-N"). Die Steigerung des Pilztrockengewichtes der auf Nicotinsäureamid umgepflanzten Kulturen beruht auf einer Zunahme des Ätherlöslichen und anderer N-freier Zellsubstanz. Nicotinsäureamid hemmt jedoch die Synthese des Ätherlöslichen um rund 5o% gegenüber der Kontrolle.

Bei T o r u l o p s i s liegen unter den gleichen Bedingungen andere Verhältnisse vor: Das Nicotinsäureamid wird rasch gespalten. Nach 16 h Kulturdauer liegen rund 55% des gebotenen Amid-N als NH_4-N in der Nährlösung vor. Der Gesamt-N-Gehalt des Mycels nimmt von 16,2 auf 2o,9 mg zu (siehe Ansatz mit $1 \cdot 1o^{-1}$mMol/ml). Es sind somit rund 14% des Amid-N der Nährlösung zu diesem Zeitpunkt assimiliert worden. Damit ist eine Zunahme des Trockengewichtes verbunden. Nach 28 h Kulturdauer ist die Kontrollkultur ohne N auf 38o,5 mg, die Ansätze mit Nicotinsäureamid hingegen sind auf über 4oo mg Trockengewicht gestiegen.

Die Synthese ätherlöslicher Verbindungen ist aber auch bei T o r u l o p s i s durch Nicotinsäureamid gehemmt worden: Im Ansatz ohne N-Quelle steigt das Ätherlösliche von 28,2 mg (Zeitpunkt der Umpflanzung) auf 41,5 mg (nach 28 h); in den Kulturen auf Nicotinsäureamid nimmt das Ätherlösliche weniger zu (3o,o bis 35,2 mg nach 28 h). Der prozentuale Fettgehalt in den Nicotinsäureamid-Kulturen ist damit etwas geringer als in der Kontrolle und zum Zeitpunkt der Umpflanzung.

Diese Ergebnisse zeigen, daß höhere Konzentrationen von Nicotinsäureamid, die bei Aufwuchskulturen kein Wachstum ermöglichen (siehe Tab.14), durch vorgezogene Pilzdecken von T o r u l o p s i s als N-Quelle genutzt werden können. Die Unterschiede im Ätherlöslichen bei T o r u l o p s i s sind - absolut und prozentual - geringer als bei den vergleichbaren Ansätzen mit E n d o m y c o p s i s . Das liegt daran, daß E n d o m y c o p s i s ein guter Fettbildner ist, T o r u l o p s i s hingegen nicht zu starker Fettbildung angeregt werden kann. Die geringen, aber gesicherten Unterschiede im Ätherlöslichen sind deshalb im gleichen Sinne wie bei E n d o m y c o p s i s zu interpretieren.

D. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

1. Zum Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Schwankungen im Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt in Abhängigkeit von der Kulturdauer sind für eine Reihe von Mikroorganismen beschrieben worden (z.B. N.N. MALTSEVA, 1961; H. AURICH u. H.-P. KIEBER, 1962; R. PRATT u. E. JOHNSON, 1964; H. SUOMALAINEN u. Mitarb., 1965). Dabei hat es sich gezeigt, daß die höchsten Werte (bezogen auf 1 g Trockensubstanz) sowohl zu Beginn (oder während der stärksten Entwicklungsphase) als auch am Ende einer Kultur auftreten können und nicht mit der maximalen Produktion anderer Vitamine parallellaufen (siehe K.G. ZINOVJEVA u. T.M. KLYUSHNIKOVA, 1962). Die Untersuchungen über den Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt der Hefen E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p s i s u t i l i s haben gleichfalls in Abhängigkeit von der Kulturdauer sich ändernde Werte ergeben. Bei T o r u l o p s i s ist nach einem kurzen Abfall in den jungen Kulturen ein starker Anstieg im prozentualen Nicotinsäure-Gehalt zu beobachten, der erst dann zum Stillstand kommt, wenn die N-Aufnahme durch die Hefe stark reduziert ist. Bei E n d o m y c o p s i s ist in jungen Kulturen der Nicotinsäure-Gehalt am höchsten und nimmt mit fortschreitendem Alter ständig ab. Dieser Organismus zeigt also maximale Nicotinsäure-Produktion zu dem Zeitpunkt, bei dem die Zellen die besten Nährbedingungen vorfinden, die stärkste Vermehrung zeigen und nur wenig Reservestoffe (Fette) produzieren. In dieser Kulturphase liegt durch die zur Zellteilung erforderliche Nuclein-

säure- und Protein-Synthese ein sehr starker N-Stoffwechsel vor, so daß eine Beziehung zwischen dem N-Stoffwechsel und der Nicotinsäure-Synthese abgeleitet werden kann. - Eine Abhängigkeit der Nicotinsäure-Bildung von der N-Konzentration der Nährlösung hat auch K. WIHERVAARA (1967) für einen Bäckerhefen-Stamm beschrieben. Danach zeigt dieser Stamm nach Animpfung einer Schüttelkultur mit weniger Zellmasse eine wesentlich höhere Nicotinsäure-Konzentration als nach Beimpfung mit einer 5o mal größeren Zellzahl. - Da die Nicotinsäure-Synthese immer über den NAD-Biosyntheseweg verläuft (siehe Abb.1), kann aus dem erhöhten Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt auf einen erhöhten Pyridinnucleotid-Spiegel beziehungsweise einen größeren Pyridinnucleotid-Bedarf geschlossen werden, der sich in der Phase einer starken Eiweißproduktion einstellt.

J. LONDON (1966) konnte nachweisen, daß die NAD-Synthese bei B a c i l l u s c e r e u s zu dem Zeitpunkt reduziert wird, zu dem die in das Nährmedium ausgeschiedene Essigsäure-Menge eine verstärkte Funktion des Tricarbonsäure-Cyclus induziert. Wird der bei E n d o m y c o p s i s mit zunehmendem Kulturalter ansteigende prozentuale Fettgehalt (siehe u.a. M. STEINER u. H. KATING, 196o) in Verbindung mit einer erhöhten Aktivität des Citrat-Cyclus gesehen, könnte auch bei diesem Organismus auf einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Gehaltsminderung von Nicotinsäure und der verstärkten Fettsynthese älterer Kulturen geschlossen werden. Mit dem steigenden Fettgehalt ist aber der gleichzeitige Abfall des prozentualen Gesamt-N zu berücksichtigen. Bezieht man den Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt auf diese Werte, so zeigt sich keine große Verände-

rung. Das Verhältnis Gesamt-Nicotinsäure zu Gesamt-N bleibt während des ganzen Kulturverlaufs mit o,oo3o : 1 praktisch konstant, so daß die Verminderung des Nicotinsäure-Gehaltes mit steigendem Kulturalter sich nur auf das Trockengewicht, nicht aber auf den N-Gehalt bezieht.

Die Untersuchungen der N-arm (o,25% Asparagin) gezogenen E n d o m y c o p s i s -Kulturen ergänzen diese Ergebnisse. Nach den Befunden von H. RAAF (1941) zeigt E n d o m y c o p s i s bei N-armer Aufzucht eine wesentlich stärkere Fettsynthese. Unter diesen Umständen steigt der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt, bezogen auf den Gesamt-N der Kultur, an. In den älteren Kulturen ist der Anstieg bis auf ca. o,oo4o : 1 zu beobachten. — Einen geringen Anstieg in der Nicotinsäure-Konzentration (bezogen auf den Protein-Gehalt) bei N-armer Anzucht gegenüber den N-reich gezogenen Kulturen haben auch N. NIELSEN u. G. SCHNEIDER (1957) bei R h o d o t o r u l a g r a c i l i s festgestellt. — Diese Zunahme (vgl. T o r u l o p s i s , S.4o) kann zur Zeit nicht erklärt werden. Sie zeigt aber, daß bei gesteigerter Fettproduktion eine Hemmung der NAD-Synthese bei E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s nicht eintritt und daß die Nicotinsäure-Synthese bei dieser Hefe nicht allein eine Funktion der N-Konzentration in der Nährlösung ist. — Es sei darauf verwiesen, daß M.R. BORUKAYEVA (1967) an drei C a n d i d a -Stämmen nachgewiesen hat, daß auch die Art der C-Quelle einen Einfluß auf die Nicotinsäure-Synthese ausüben kann.

Ein Vergleich der Untersuchungen über den Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p s i s u t i l i s macht den Unterschied zwischen

der Fetthefe und der Eiweißhefe deutlich. Im Gegensatz zur Gehaltsabnahme bei Endomycopsis steigt die auf 1 g Trockensubstanz berechnete Nicotinsäure-Menge bei Torulopsis mit fortschreitender Kulturdauer ständig an und erreicht dabei mit etwa 4oo µg Nicotinsäure fast die dreifache Menge. Auch bei einer Berechnung des Nicotinsäure-Gehaltes auf den Gesamt-N der Trockensubstanz kommt eine verstärkte Nicotinsäure Produktion mit zunehmendem Kulturalter zum Ausdruck. Das Nicotinsäure-Stickstoff-Verhältnis steigt von o,oo38 : 1 auf o,oo78 : 1 an. Somit läßt sich auch für Torulopsis utilis ein Zusammenhang zwischen der Nicotinsäure-Produktion und dem N-Stoffwechsel aufzeigen (vgl. K. WIHERVAARA, 1967), der vor allem dadurch deutlich wird, daß bei dieser sogenannten Eiweißhefe keine verstärkte Fettsynthese eintritt (siehe M. STEINER u. H. KATING, 196o) und ein relativ (bezogen auf Endomycopsis) intensiver N-Stoffwechsel während des ganzen Kulturverlaufs erhalten bleibt.

Der auffallende Zusammenhang zwischen der verstärkten Nicotinsäure-Bildung und einem erhöhten N-Stoffwechsel muß wahrscheinlich unter dem Gesichtspunkt eines gesteigerten Bedarfs an gebundener Nicotinsäure (Pyridinnucleotide) gesehen werden. Die Pyridinnucleotide sind u.a. auch als Coenzyme in bestimmten Transaminasen wirksam. Eine Induktion der Aktivität spezifischer Transaminasen durch entsprechende Aminosäuren als N-Quellen konnten u.a. J.R.S. FINCHAM u. A.B. BOULTER (1955) bei Neurospora crassa nachweisen. Eine jeweils dadurch verursachte Umstimmung des gesamten Stoffwechsels durch die unterschiedlichen N-Quellen diskutieren H. AURICH u. H.-P. KLEBER (1962).

Die Untersuchungen der Restnährlösungen von beiden Versuchsor-

ganismen hatten ergeben, daß bereits bei jungen Kulturen Ni=cotinsäure-Derivate (bestimmt als Gesamt-Nicotinsäure) im Kul=turmedium auftreten. Während bei T o r u l o p s i s auch in den älteren Kulturen nur geringe Nicotinsäure-Mengen nachweis=bar sind, ist bei E n d o m y c o p s i s nach 96 h Kultur=dauer ein auffallender Anstieg dieser Substanz~~en~~ festzustellen (siehe Tab.7 und 8). Zwar läßt sich dieser spontane Anstieg mit den mikroskopisch nachweisbaren Autolyseerscheinungen in älteren Kulturen erklären, doch ist das Auftreten von wenig Nicotinsäure in dem Medium junger Kulturen mit großer Wahr=scheinlichkeit nicht auf Autolyse zurückzuführen.

Eine Ausscheidung von Nicotinsäure in die Nährlösung ist beson=ders bei Bakterien beobachtet worden (siehe u.a. auch I. YAMANE u. Mitarb., 196o; A.G. GEBGARDT, 1961; V. COLOMBATTI, 1965). A.H. ROSE (196o) konnte zeigen, daß ein biotin-heterotropher S a c c h a r o m y c e s -Stamm bei suboptimalen Biotin-Gaben größere Mengen von Nicotinsäure-Derivaten ausscheidet (siehe auch A.H. ROSE u. W.J. NICKERSON, 1956). Zum anderen berichtet K. WIHERVAARA (1967), daß eine Bäckerhefe nur bei geringer N-Aufnahme Nicotinsäure in das Medium exkretiert, jedoch nicht bei ausreichender N-Versorgung. In beiden Fällen ist demnach ein Nährstoffmangel vorhanden und es liegt nahe, gerade hier Auto=lyseerscheinungen als Erklärung heranzuziehen.

Nährstoffmangel-Bedingungen können gerade bei den jungen E n = d o m y c o p s i s - und T o r u l o p s i s -Kulturen nicht der Grund für das Auftreten von Nicotinsäure-Derivaten im Kul=turmedium sein, da in diesen noch die C- und N-Quellen in aus=reichender Konzentration vorliegen. Deshalb muß zumindest eine

teilweise aktive Exkretion für beide Versuchsorganismen angenommen werden. Auch J.C. LEWIS (1944) konnte in Schüttelkulturen eines T o r u l o p s i s -Stammes in das Medium abgegebene Nicotinsäure nachweisen (siehe auch K. HAYANO., 1964).

Daß der Nicotinsäure-Gehalt in der Restnährlösung von T o r u l o p s i s und von den jungen E n d o m y c o p s i s -Kulturen keine ebenso deutliche Abhängigkeit von der Kulturdauer zeigt wie der intrazelluläre Gehalt, kann mit den Befunden von H. KATING u. G. DREPHAL (1966) erklärt werden, daß beide Organismen Nicotinsäure beziehungsweise Nicotinsäureamid assimilieren.

2. Zur Nicotinsäure-Bildung in Abhängigkeit von der N-Quelle

J.R.S. FINCHAM u. A.B. BOULTER (1955) berichten, daß bei einer Anzucht von Mikroorganismen auf Aminosäuren die Synthese derjenigen Enzyme induziert wird, die an der Aufnahme der betreffenden Verbindungen beteiligt sind. H. AURICH u. H.-P. KLEBER (1962) sehen in der Geschwindigkeit der N-Assimilation einen entscheidenden wuchsbestimmenden Faktor, so daß das Wachstum von der Induzierbarkeit der an der Assimilation beteiligten Enzymsysteme gesteuert wird.

Obwohl Nicotinsäure u.a. auch als Baustein der Coenzyme derjenigen Dehydrogenasen auftritt, die an der Aufnahme von Aminosäuren durch die Zellen beteiligt sind, kann die bei E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p s i s u t i l i s festgestellte, zum Teil erhebliche Steigerung des Gesamt-Nicotinsäure-Gehaltes beim Wachstum auf unterschiedlichen N-Qellen nicht nur mit einer erhöhten Bildung der bei der N - A u f n a h m e wirksamen Enzyme erklärt

werden (siehe H. AURICH u. H.-P. KLEBER, 1962). Hierfür sind sicherlich auch die der Aufnahme der N-Quelle folgenden Prozesse, durch die ein erhöhter Bedarf an Nicotinsäure-Bausteinen entsteht, verantwortlich. Bei N-armer Aufzucht setzt nämlich nach Umpflanzung der Kulturen auf die neuen N-Quellen eine sehr starke Eiweißsynthese ein, und diese bedingt eine verstärkte Zunahme im Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt (siehe Endomycopsis auf Glutamin, Abb.7, und Torulopsis auf NH_4^+, Abb.14, sowie die jeweiligen Kontrollkulturen auf Asparagin). Beim Wachstum auf Ornithin (Abb.8 und 11) hingegen erfolgt die Aufnahme der N-Quelle bei beiden Organismen nicht so rasch wie bei der Asparaginkontrolle; dementsprechend ist hier die Nicotinsäure-Bildung wesentlich geringer. Die Versuche mit verschiedenen Konzentrationen der gebotenen N-Quellen zeigen weiterhin, daß bei beiden Hefen der Gesamt-Nicotinsäure-Spiegel auch durch den N-Gehalt der Nährlösung beeinflußt wird.

Obwohl K.-W. GLOMBITZA u. T. HARTMANN (1966) den Abbau von Tryptophan (ß-(Indolyl-3-)brenztraubensäure, ß-(Indolyl-3-)milchsäure , α-(Indolyl-3-)essigsäure usw.) durch Endomycopsis und Torulopsis nachgewiesen haben, vermögen diese Pilze die Aminosäure als N-Quelle zur Trockensubstanzbildung nicht zu nutzen. Um so auffallender ist es deshalb, daß dennoch die Gesamt-Nicotinsäure um 2o% (Endomycopsis) beziehungsweise 4o% (Torulopsis) ansteigt. Diese Befunde weisen darauf hin, daß Tryptophan Substrat für die Pyridinnucleotid-Synthese ist.

3. Zur Biosynthese der Nicotinsäure

Bei Angebot von Kynurenin, 3-Hydroxy-anthranilsäure und Chinolinsäure (N-äquivalent zu o,1% Asparagin) synthetisieren ruhende Kulturen (ohne C-Quelle) von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p s i s u t i l i s sehr stark Nicotinsäure. Da im Vergleich zur Kontrolle (Asparagin-Kultur) sowohl der N-Gehalt als auch das Pilztrockengewicht dieser Kulturen sich praktisch nicht ändern und der Nicotinsäure-Gehalt der Asparagin-Kultur sich nur unwesentlich erhöht, kann mit Sicherheit geschlossen werden, daß die oben genannten Zwischenverbindungen des Tryptophan-Abbaues auch von beiden Versuchsorganismen als Vorstufe zur Nicotinsäure-Synthese genutzt werden. Dies steht im Einklang z.B. mit den Ergebnissen von H. SUOMALAINEN (1963), nach denen auch bei einer Bäckerhefe durch einen Zusatz von Tryptophan-Abbauprodukten zur Nährlösung der Nicotinsäure-Gehalt erhöht wird (siehe u.a. auch C.W.H. PARTRIDGE u. Mitarb., 1952).

Die Nicotinsäure - beziehungsweise NAD-Synthese über den Tryptophan-Abbau ist vor allem für Pilze und höhere Tiere nachgewiesen worden, während die meisten Bakterien und grünen Pflanzen Nicotinsäure aus Asparaginsäure bilden (siehe Abb.1, Reaktionsschritt 15). Durch die Untersuchungen von F. AHMAD u. A.G. MOAT (1966) sowie von H.-D. HEILMANN u. F. LINGENS (1968) ist bekannt geworden, daß unter bestimmten Kulturbedingungen (Anaerobie) Hefen ebenfalls - wenn auch in geringem Maße - Nicotinsäure aus Asparaginsäure synthetisieren können. Bei anaerob kultivierter E n d o m y c o p s i s und T o r u l o p s i s haben sich jedoch keine Anhaltspunkte für eine direkte Nutzung

des Asparaginsäure-Gerüstes zur NAD-Synthese ergeben. Auch die Kulturversuche mit ^{14}C-Asparaginsäure beweisen, daß bei E n d o m y c o p s i s die Synthese nicht über diesen Weg verläuft. Auch die Möglichkeit, daß Ornithin und Lysin Vorstufen der Biosynthese von Nicotinsäure sein können, wie es z.B. von E.F. MÖLLER (1961) diskutiert wird, kann für beide Organismen unter den durchgeführten Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden (siehe Abb.8 und 11 bzw. 9 und 12).

Während die als Abbauprodukte des Tryptophans auftretenden Verbindungen Kynurenin, 3-Hydroxy-anthranilsäure und Chinolinsäure bei beiden Organismen eine starke Nicotinsäure-Synthese bewirken, fällt auf, daß Tryptophan (siehe Abb.1o und 13) diese Synthese kaum fördert. Eine toxische Wirkung des Tryptophans auf die Versuchsorganismen konnte nicht festgestellt werden. Es muß angenommen werden, daß E n d o m y c o p s i s und T o r u l o p s i s entweder Tryptophan nur sehr schwer assimilieren können oder daß diese Aminosäure bereits extrazellulär über den nichtoxydativen Weg (über ß-(Indolyl-3-)brenztraubensäure) abgebaut wird. Immerhin sind von K.-W. GLOMBITZA u. T. HARTMANN (1966) größere Mengen solcher Tryptophan-Kataboliten in der Restnährlösung dieser Pilze gefunden worden.

H. SUOMALAINEN (1963) konnte bei seinen Untersuchungen eine Abhängigkeit zwischen der gesteigerten Nicotinsäure-Produktion und dem jeweils als Substrat eingesetzten Tryptophan-NAD-Metaboliten nachweisen. Danach nimmt mit fortschreitender Stellung der jeweiligen Verbindungen in der Biosynthesekette auch der Nicotinsäure-Gehaltsanstieg zu. Diese bei einer Bäckerhefe auftretenden Zusammenhänge konnten bei E n d o m y c o p s i s

und T o r u l o p s i s nicht beobachtet werden. Hier bewirkt die Chinolinsäure, die in der Reaktionsfolge als unmittelbare Vorstufe des Pyridinnucleotid-Bausteins anzusehen ist, eine auffallend niedrigere Nicotinsäure-Bildung als das "entfernter" auftretende Kynurenin.

4. Zur physiologischen Wirkung

Für die durch Zusatz von Nicotinsäure oder Nicotinsäureamid zur normalen Nährlösung hervorgerufene Wachstumshemmung bei E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s beziehungsweise durch Nicotinsäureamid bei T o r u l o p s i s u t i l i s kann hinsichtlich des Wirkungsmechanismus noch keine befriedigende Erklärung gegeben werden. Es fällt auf (siehe Tab.14), daß T o r u l o p s i s nur durch Nicotinsäureamid gehemmt wird, obwohl dieser Organismus eine sehr wirksame Nicotinsäureamid-desamidase besitzt, durch die dieses Amid sehr rasch zu der nicht hemmenden Nicotinsäure hydrolysiert wird. Das Wachstum von E n d o m y c o p s i s wird durch Nicotinsäureamid stärker gehemmt als durch die Säure.

Hinsichtlich einer hemmenden Wirkung von Nicotinsäure oder Nicotinsäureamid auf bestimmte Enzymsysteme liegen in der Literatur mehrere Befunde vor. Z.B. berichteten D.M. BOWEN u. R.E. OLSON (1964) über eine durch Nicotinsäure gehemmte Squalencyclisierung bei S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e ; R.K. GHOLSON u. J. KORI (1964) konnten eine Hemmung der Chinolinsäure-decarboxylase-Aktivität sowie der Nicotinsäure-mononucleotid-pyrophosphorylase-Wirkung bei B a c i l l u s s u b t i l u s nachweisen. Da auch nach anderen Berichten be-

sonders die am NAD-Stoffwechsel beteiligten Enzyme durch Nicotinsäure gehemmt werden (siehe z.B. K.F. PETERSEN, 1962; R.E. SAXTON u. Mitarb., 1968), ist es möglich, daß die Wachstumshemmung auf einer Blockade des NAD-Stoffwechsels beruht (vgl. Diskussion auf S.97).

Wird vorgezogenen E n d o m y c o p s i s -Pilzdecken Nicotinsäureamid als alleiniger N-Quelle geboten, so sind folgende Befunde bemerkenswert: 1. Der Amid-N des Substrates kann nicht zur Eiweißsynthese genutzt werden; 2. Die Synthese ätherlöslicher Zellkomponenten ist durch die Gegenwart von Nicotinsäureamid stark vermindert. Diese bei E n d o m y c o p s i s gewonnenen Ergebnisse können offenbar nicht uneingeschränkt auf alle Organismen übertragen werden. Im Gegensatz zu E n d o m y c o p s i s nutzen vorgezogene Pilzdecken von T o r u l o p s i s den Amid-N auch bei höheren Konzentrationen von Nicotinsäureamid mittels einer stark wirksamen Desamidase zur Eiweißproduktion. Allerdings wird die Fettsynthese auch bei T o r u l o p s i s durch Nicotinsäureamid vermindert.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit zunehmendem Kulturalter nimmt bei Endomycopsis vernalis der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt, berechnet auf 1 g Trockensubstanz, ständig ab (von 229 auf 153 µg), während er bei Torulopsis utilis stetig zunimmt (von 219 bis 397 µg). Im Kulturfiltrat junger Aufwuchskulturen der Versuchsorganismen sind geringe Mengen an Nicotinsäure-Derivaten (bestimmt als Gesamt-Nicotinsäure) nachweisbar. Sie erhöhn sich mit zunehmendem Alter der Kulturen von Torulopsis nur unwesentlich, während sie bei älteren Endomycopsis-Kulturen stark zunehmen.

2. In beiden Versuchsorganismen nimmt die Nicotinsäure-Bildung mit steigender N-Konzentration der Nährlösung zu.

3. In jungen Umpflanzkulturen (auf verschiedenen N-Quellen) bestimmt die Geschwindigkeit der N-Assimilation die Höhe der Nicotinsäure-Bildung. - Endomycopsis und Torulopsis zeigen auf Tryptophan als N-Quelle kein Wachstum. Bei Umpflanzung auf dies Substrat ist lediglich ein geringer Anstieg im Nicotinsäure-Gehalt festzustellen.

4. Die Biosynthese der Nicotinsäure erfolgt bei Endomycopsis vernalis und Torulopsis utilis über den Tryptophan-Abbauweg: Geringe Mengen Kynurenin, 3-Hydroxy-anthranilsäure und Chinolinsäure bewirken bei ruhenden Kulturen (ohne C-Quelle) einen starken Anstieg im Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt der Versuchsorganismen.

5. Anaerob gehaltene Oberflächenkulturen der Versuchsorganismen

können Asparaginsäure und Glycerin nicht direkt zur Nico= tinsäure-Synthese nutzen. In Umpflanzkulturen von E n d o = m y c o p s i s v e r n a l i s auf ^{14}C-markierter Aspara= ginsäure war keine radioaktive Nicotinsäure nachweisbar.

6. Acetontrockenpulverextrakte von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s und T o r u l o p s i s u t i l i s besit= zen unterschiedlich stark wirksame Nicotinsäureamid-desamidasen.

7. Die spezifische Aktivität der E n d o m y c o p s i s-Desamidase steigt in jungen Kulturen an und sinkt in älteren. Das pH-Optimum der E n d o m y c o p s i s -Desamidase liegt im Phosphat-Puffer beim pH-Wert 7,8; das Temperaturoptimum bei 33° C. Bei 52° C ist das Enzym vollständig denaturiert. Mg^{++}-ionen (5 µMol) beeinflussen die Desamidase-Wirkung nicht. Zusatz von Mn^{++}-ionen (1 µMol) und EDTA (5 µMol) hemmt die Desamidase-Aktivität. α,α'-Dipyridyl und 8-Hydroxy-chinolin (5 µMol) bewir= ken eine Aktivitätssteigerung. Zusatz von Cu^{++}-(2,5 µMol) sowie Co^{++}-ionen (2,5 µMol) ruft eine geringe jedoch unspezifische Aktivitätsminderung hervor.

8. T o r u l o p s i s u t i l i s besitzt im Vergleich zu E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s eine auf die Einheit (µMol NH_3/mg Protein/ 1 h) bezogene wesentlich wirksamere Nico= tinsäureamid-desamidase. Die spezifische Aktivität der Desamidase steigt in jungen Kulturen zunächst an und bleibt dann während des weiteren Kulturverlaufs auf gleicher Höhe. Sie ist im pH-Bereich von 5,o bis 9,6 mit einem ausgeprägten Optimum beim pH-Wert 5,5 (Phosphat-Puffer) wirksam. Sie ist wärmestabiler als die E n d o m y c o p s i s -Desamidase und wird erst bei Temperaturen zwischen 65° und 7o° C vollständig inaktiviert.

9. Glutathion, L-Cystein, Mg^{++}-ionen und EDTA (5 µMol) haben keinen Einfluß auf die Desamidase-Wirkung. Die Hemmung durch p-CMB wird durch L-Cystein-Zusatz wieder aufgehoben. α,α'-Dipyridyl-Zusatz (2,75 µMol) bewirkt eine Aktivitätsabnahme um 7o%.

1o. Aus den jeweiligen Unterschieden in der pH-Optimumskurve, der Wärmeempfindlichkeit sowie dem Verhalten gegenüber chemischen Agentien (siehe u.a. die Reaktion auf den Zusatz von SH-Gruppen-Inhibitoren) der Desamidasen wird geschlossen, daß die Enzyme von beiden Hefen unterschiedlich (Isoenzyme) sind.

11. Das Wachstum von E n d o m y c o p s i s v e r n a l i s wird durch $5 \cdot 1o^{-4}$ mMol Nicotinsäureamid deutlich und durch $1 \cdot 1o^{-3}$ mMol dieser Verbindung in 1 ml Nährlösung vollständig gehemmt. $1 \cdot 1o^{-2}$ mMol Nicotinsäure/ml hemmen das Wachstum vollständig. - Der Amid-N des Nicotinsäureamids kann durch vorgezogene Pilzdecken von E n d o m y c o p s i s nicht zur Eiweißsynthese genutzt werden. Nicotinsäureamid vermindert in Umpflanzkulturen vornehmlich die Synthese ätherlöslicher Zellkomponenten.

12. Das Wachstum von T o r u l o p s i s u t i l i s wird nur durch höhere Gaben von Nicotinsäureamid ($4 \cdot 1o^{-2}$ mMol/ml) unterbunden. Geringe Konzentrationen fördern die Trockensubstanzproduktion. Nicotinsäure hemmt das Wachstum nicht. Trokkensubstanzproduktion und Gesamt-N-Gehalt steigen bei Nicotinsäureamid als alleiniger N-Quelle. Die Fettsynthese wird in gleicher Weise wie bei E n d o m y c o p s i s durch Nicotinsäureamid gehemmt.

F. ARBEITSVORSCHRIFTEN

1. Nicotinsäurebestimmung

Der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt wurde nach dem von H.C. GOLD=THORPE u. D. TIPPIT (1951) beschriebenen Verfahren, das ge=ringfügig abgewandelt wurde, photometrisch bestimmt. In vier Meßkölbchen (25 ml) und einem Reagenzglas werden jeweils 3 ml Zellhydrolysat (siehe hierzu S. 15) mit den in der folgen=den Tabelle aufgeführten Lösungen in der angegebenen Reihen=folge versetzt. Im Ansatz Nr.1 wird der Nicotinsäurefarbstoff gebildet; die Ansätze Nr.2 und 3 ergeben die Reagenzienblind=werte vgl. S.28ff); gegen Ansatz Nr.4 (Eigenfärbung der Untersuchungslösung) erfolgt die Nullpunktseinstellung bei der Extinktionsmessung; mit dem in einem kurzen Reagenzglas durchgeführten Ansatz Nr.5 wird der für die Bromcyanreaktion erforderliche pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls die für seine Korrektur auf 5,1 notwendige Menge einer Citronensäure-Lösung (1o g/1oo ml wässriger Lsg.) oder Natriumhydrogen=phosphat-Lösung (1o g/1oo ml wässriger Lsg.) ermittelt. - Zur Bestimmung eines Extinktions-Standard-Wertes kann ein weite=rer Ansatz - parallel zu Nr.1 - mit zusätzlich o,5 ml einer Nicotinsäure-Lösung bekannter Konzentration mitgeführt werden.

Nach Einpipettieren von Untersuchungslösung und Pufferlösung wird in Ansatz Nr.5 nach Zugabe von 4 ml Bromcyanlösung der pH-Wert gemessen und - wenn notwendig - eine Korrektur des pH-Wertes auf 5,1 auch in den Ansätzen Nr.1 bis Nr.4 durch=geführt. Dann wird in einem verdunkelten Raum bei diffusem Kunstlicht die Bromcyanlösung einpipettiert (Kolbenpipette!); die Kölbchen werden schnell verschlossen, gut geschüttelt und

Ansatz Nr.	1	2	3	4	5
	ml	ml	ml	ml	ml
Hydrolysat	3	3	3	3	3
McIlvaine-Puffer[9])	3	3	3	3	3
Wasser	-	4	-	-	-
					pH-Wert-Kontrolle
Reaktion unter Lichtausschluß					
Bromcyan-Lösung[9])	4	-	4	-	
Metolsulfat-Lösung[9])	14	14	-	-	
o,1 n H_2SO_4	25	25	25	25	

zur Reaktion 3o min lang unter Lichtausschluß in einem Thermostaten bei 25°C belassen. Danach werden die Kölbchen in kaltem Wasser auf 1o° bis 15°C abgekühlt, die Ansätze Nr.1 und Nr.2 mit kalter Metolsulfat-Lösung versetzt und alle Kölbchen mit o,1 n H_2SO_4 bis zur Marke aufgefüllt. Zur Bildung des Nicotinsäurefarbstoffs werden die Ansätze dann 8o min lang bei 1o° bis 15°C in Dunkelheit belassen. Die Extinktionen werden gegen die Eigenfärbung der Analysenlösung (Ansatz Nr.4) bei einer Wellenlänge von 41o nm und einer Schichtdicke von 5 cm im Spektralphotometer gemessen. Der Extinktionswert des Nicotinsäurefarbstoffs wird aus der Differenz (ΔE) der Extinktionen von Ansatz Nr.1 und der Summe der Ansätze Nr.2 und 3 nach der Formel

$$\Delta E = E_1 - (E_2 + E_3)$$

berechnet ($E_{1\ bis3}$ = Extinktion der Ansätze Nr.1 bis 3). Der diesem Extinktionswert entsprechende Nicotinsäure-Gehalt kann

---

[9]) McIlvaine-Puffer: 19,o6 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (Fa. Merck) und 9,75 g Citronensäure $\cdot H_2O$ (Fa. Merck)/1ooo ml wässriger Lösung; pH-Wert 5.25.
Bromcyan-Lösung: 4g Bromcyan (Fa. Schuchardt)/1oo ml wässr. Lsg.
Metolsulfat-Lösung: 5 g Photo-Rex (Fa. Merck)/ 1oo ml o,1 n H_2SO_4

aus einer Eichgeraden entnommen werden oder mittels des extern bestimmten Faktors F ($= \frac{Stdd}{E_{Stdd}}$; Stdd = Nicotinsäure-Standard in µg, E_{Stdd} = der entsprechende Extinktionswert) errechnet werden. Der Gesamt-Nicotinsäure-Gehalt von 1 g Trockensubstanz errechnet sich dann nach der Formel:

$$\frac{E_1 - (E_2 + E_3) \cdot 25 \cdot Stdd}{mg\ Einwaage \cdot 3 \cdot E_{Stdd}} \cdot 1000 = \mu g\ Nicotinsre./g\ Trockensubstanz$$

Hierbei bedeuten: 25 = Gesamtvolumen der Untersuchungslösung in ml; 3 = zur Bestimmung entnommene Menge der Untersuchungslösung in ml.

2. Bestimmung des Gesamt-Stickstoff-Gehaltes

Der Gesamt-N-Gehalt der Pilztrockensubstanz wurde nach dem Mikro-Kjeldahl-Verfahren bestimmt (J.K. PARNAS u. R. WAGNER, 1921): 5 bis 12 mg der fein zermahlenen Substanz werden in ein gut getrocknetes Aufschlußkölbchen genau eingewogen und nach Zusatz einer kleinen Menge (ca. 4 mg) Selenreaktionsgemisch (Fa. Merck) mit 2 ml konzentrierter Schwefelsäure (p.a., Fa. Merck) versetzt; zur Blindwertbestimmung werden 2 Kölbchen ohne Trockensubstanz mitgeführt. Die Kölbchen werden dann in einem Veraschungsgestell auf kleinen Gasflammen bis zur annähernden Farblosigkeit (nach 2 bis 4 h) erhitzt. Nach kurzzeitiger Abkühlung wird den Lösungen ein Tropfen Wasserstoffperoxyd (3o%ig, Fa. Merck) zugesetzt und der Veraschungsprozeß anschließend 3o min lang fortgesetzt.

Zur Destillation des gebildeten Ammoniaks aus dem Schwefelsäureaufschluß ist die Mikro-Kjeldahl-Apparatur nach J.K. PARNAS (1938) benutzt worden. In diese wird die Reaktionslösung eines Kölbchens durch Nachspülen mit Wasser quantitativ übertragen

und nach Zugabe von zwei Tropfen Tashiro-Indikator[10]) zur Alkalisierung vorsichtig mit 8 ml konzentrierter Kalilauge versetzt. - Als Vorlage dienen 10 ml einer 0,01 n Schwefelsäure. Nach der Destillationsdauer von 10 min wird die Vorlage zur schnelleren Vertreibung von CO_2 auf 80° bis 90°C erhitzt und nach Zugabe von fünf Tropfen Tashiro-Indikator mit 0,01 n Natronlauge aus einer automatischen Pellet-Bürette bis zur Farblosigkeit titriert. Aus dem Verbrauch der Natronlauge läßt sich der Stickstoffgehalt nach der Formel errechnen:

$$\frac{(ml_{Bl} - ml_{Pr}) \cdot F \cdot 0,14 \cdot 1000}{mg\ Einwaage} = mg\ N/g\ Trockensubstanz.$$

Hierbei bedeuten: ml_{Bl} = Natronlaugenverbrauch bei der Blindwertbestimmung; ml_{Pr} = Natronlaugenverbrauch bei der Substanzanalyse; F = Faktor der 0,01 n NaOH-Lösung; 0,14 = 0,14 mg N, die 1 ml 0,01 n H_2SO_4 äquivalent sind.

3. Ammoniak-Bestimmung nach E.J. CONWAY (1962)

Die quantitative Bestimmung des durch die Desamidase-Wirkung aus Nicotinsäureamid freigesetzten Ammoniaks wird in Conway-Schalen durchgeführt. Hierzu wird der geschliffene Rand der Schalen zuvor leicht eingefettet (Exsikkatorenfett der Fa. Riedel-de Haen) und die zentrale Kammer mit 1 ml Borsäurelösung[11]) beschickt. Nach Übertragen der Reaktionslösung in die

---

[10]) Tashiro-Indikator: 100 ml aethanolische Methylrot-Lösung (heiß gesättigt) werden mit 4,5 ml Methylenblau-Lösung (0,5 g/100 ml wässr. Lsg.) versetzt und mit Aethanol auf 120 ml aufgefüllt.

[11]) Borsäure-Indikator-Lösung: 5 g Borsäure werden in 200 ml Aethanol und 700 ml CO_2-freiem deionisiertem Wasser gelöst, mit 10 ml Mischindikator (0,033% Bromkresolgrün und 0,066% Methylrot in aethanolischer Lösung) versetzt, mit CO_2-freiem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und mit einigen Tropfen 1 n NaOH auf einen schwach roten Farbton eingestellt.

äußere Kammer (unter Nachspülen mit o,5 ml deionisiertem Wasser) wird die Schale sofort mit einer runden Glasscheibe bis auf einen kleinen Spalt bedeckt, durch den rasch 1 ml einer gesättigten Kaliumcarbonat-Lösung (11o g K_2CO_3 in 1oo ml deionisiertem Wasser) ebenfalls in die äußere Kammer einpipettiert werden. Die Schale wird gleich darauf gänzlich verschlossen und die Lösungen (äußere Kammer) durch kreisende Bewegung gemischt. Die Schalen werden darauf mindestens 1o h lang bei Zimmertemperatur belassen, während derer das durch das Carbonat verdrängte Ammoniak von der Borsäure-Lösung in der inneren Kammer absorbiert wird. Nach dieser Zeit wird das Ammoniak in der inneren Kammer mit o,o1 n HCl aus einer Enzym-Test-Pipette (o,2 ml, 1/1ooo Graduierung, Kolbenmikrometerschraube) rücktitriert.

4. Eichkurve zur Eiweißbestimmung

Der Protein-Gehalt der Acetonpulver-Extrakte wurde nach der Methode von D.H. LOWRY u. Mitarb. (1951) bestimmt. Hierzu werden folgende Reagenzlösungen benötigt:

A: 2,o g Natriumcarbonat in 1oo ml Lsg. (o,1 n NaOH)

B: o,5 g Kupfersulfat · 5 H_2O in 1oo ml wässr. Lsg.

C: 1,o g Kalium-Natrium-tartrat in 1oo ml wässr. Lsg.

Eiweißreagenz-Lösung: 5o ml der Lösung A werden mit je 1 ml der Lösungen B und C versetzt. Das Gemisch ist etwa 1 Tag lang haltbar.

D: Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (Fa. Merck).

Zur Aufstellung einer Eichkurve werden 1o mg Serumalbumin vom Rind (Fa. Behringwerke) in Wasser gelöst. Von der Lösung werden Verdünnungsreihen hergestellt, die jeweils 1o bis 8o µg Protein in 1 ml enthalten. In Parallelansätzen werden diese jeweils mit 5 ml Eiweißreagenz-Lösung versetzt, gut geschüttelt und 1o min lang bei Raumtemperatur belassen. Nach Zusatz von o,5 ml Folin-

Ciocalteus-Phenolreagenz, das sofort gründlich vermischt wer= den muß, wird das Gemisch 3o min lang stehengelassen, worauf (spätestens aber nach 2 h) die Transmission im Spektralphoto= meter bei 75o nm gegen die Reagenz-Lösung gemessen wird.

5. Nachweis auf Sauerstoff-Freiheit eines Gasgemisches

Der Nachweis der Sauerstoffmangel-Bedingungen für die Anaero= bie der Oberflächenkulturen wurde nach der Methode von J.A. ULRICH u. A.M. LARSEN (1948) geführt.

Indikator-Lösung:

4,o g Glucose
2,o g Natriumhydrogen-arsenat · 7 H_2O
o,oo3 g Methylenblau-Lösung (85%)
1oo ml deionisiertes Wasser

5 ml dieser Lösung werden in einem Reagenzglas bis zur Farblo= sigkeit erhitzt, wobei das Reagenzglas mit einem Gummistopfen verschlossen wird, durch den eine Gaseinlaßkanüle und ein Bun= senventil führen. Die farblose Lösung wird sofort mit dem zu prüfenden Gas beschickt. Bei Abwesenheit von Sauerstoff bleibt die Methylblau-Lösung farblos.

G. LITERATURVERZEICHNIS

AHMAD, F. und MOAT, A.G. : J. Biol. Chem. 241, 775-780 (1966)

ALEXOPOULOS, C.J. : Einführung in die Mykologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1966)

AURICH, H. und MÜCKE, D. : Phyton 12, 109-119 (1959)

AURICH, H. und KLEBER, H.-P. : Acta Biol. Med. Germ. 9, 641-651 (1962)

BANDIER, E. und HALD, J. : Biochem. J. 33, 264-271 (1939)

BARTON-WRIGHT, E.C. und BOATH, R.G. : Lancet 1, 565-568 (1944)

BLAGODATSKAYA, V.M. und ODINTSOVA, E.N. : Mikrobiologiya 36, 416-421 (1967)

BÖDDEKER, H. und MISHKIN, A.R. : Anal. Chem. 35, 1662-1663 (1963)

BONNER, D.M. und WASSERMANN, E. : J. Biol. Chem. 185, 69-74 (1950)

BORUKAYEVA, M.P. : Mikrobiologiya 36, 576-579 (1967)

BOWEN, D.M. und OLSON, R.E. : Nature 203, 762-763 (1964)

BUNKER, H.J. : in: Biochemistry of industrial microorganisms. Ed. Rainbow, C. und Rose, A.H.; Acad. Press, London-New York (1963)

CHAKRABARTI, J.K. und GUHA, A.K. : Nature 178, 538-539 (1956)

CHANG, W. und PETERSON, W.H. : J. Bacteriol. 58, 33-44 (1949)

CHAYKIN, S. : Ann. Review of Biochemistry 36, 149-170 (1967)

COLOMBATTI, V. : Farmaco (Pavia) Ed. Prat. 20, 593-595 (1965)

CONWAY, E.J. : Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood, London (1962)

CREYF, S. und ROOSENS, L. : Mededel. Vlaam. Chem. Ver. 19, 1-11 (1957); cit. CA 51, 16303 d

DALGLIESH, C.E., KNOX, W.E. und NEUBERGER, A. : Nature 168, 20-22 (1951)

DANN, W.J. und HANDLER, Ph. : J. Biol. Chem. 140, 201-213 (1941)

DIETRICH, L.S., FULLER, L., YERO, I.L. und MARTINEZ, L. J. Biol. Chem. 241, 188-191 (1966)

ECKERT, L. : Dissertation, Marburg (1968)

ECKERT, L. und KATING, H. : Arch. Mikrobiol. 64, 173-202 (1968)

EDDY, A.A. : in: The chemistry and biology of yeasts. Ed. A.H. Cook; Acad. Press., New York (1958)

EULER, H. v., ALBERS, H. und SCHLENK, F. : Z. physiol. Chem. 240, 113-126 (1936)

FEIGELSON, P., WILLIAMSON, J.N. und ELVEHJEM, C.A. : J. Biol. Chem. 189, 361-369 (1951)

FINCHAM, J.R.S. und BOULTER, A.B. : J. Gen. Microbiol. 13, V-VI (1955)

FRIEDEMANN, T.E. und FRAZIER, E.I. : Arch. Biochem. 26, 361-374 (1950)

GASSMANN, B. und TÄUFEL, K. : Nahrung 2, 371-387 (1958)

- - Nahrung 2, 421-443 (1958)

GASSMANN, B. : Nahrung 4, 149-152 (1960)

GEBGARDT, A.G. : Trudy Inst. Microbiol., Akad. Nauk SSSR 292-300 (1961)

GEORG, L.K. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 72, 653-655 (1949)

GHOLSON, R.K. und KORI, J. : J. Biol. Chem. 239, PC 2399-2400 (1964)

GHOLSON, R.K. : Nature 212, 933-935 (1966)

GLOMBITZA, K.-W. : J. Chromat. 19, 320-325 (1965)

- - Arch. Mikrobiol. 57, 39-42 (1967)

GLOMBITZA, K.-W. und HARTMANN, T. : Planta 69, 135-149 (1966)

GOLDTHORPE, H.C. und TIPPIT, D. : Anal. Chem. 23, 484-487 (1951)

GORYAYEW, M.I., TRETYAKOW, L.I., TUREBYEKOW, S.S., PUGAZEW, M.B., TURZUMETOWA, F.U. und IBRAYEW, G.S. : Isw. Akad. Nauk Kas. SSR, Ser. Chim. 17, 87-91 (1967)

GROSS, D., FEIGE, A., ZURECK, A. und SCHÜTTE, H.-R. : Z. Natur= forschg. 22 b, 835-838 (1967)

GROSS, D., BANDITT, P., ZURECK, A. und SCHÜTTE, H.-R. : Z. Na= turforschg. 23 b, 390-391 (1968)

HAENEL, H. und MÜLLER-BEUTHOW, W. : Klin. Wochschr. 34, 643-644 (1956)

HALPERN, Y.S. und GROSSOWICZ, N. : Biochem. J. 65, 716-720 (1957)

HARRIS, L.J. und RAYMOND, W.D. : Biochem. J. 33, 2037-2051 (1939)

HASSE, K. : in: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. IX. Ed. W. Ruhland; Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1958)

HEIDE, S. : Arch. Mikrobiol. 10, 135-188 (1939)

HEILMANN, H.-D. und LINGENS, F. : Z. physiol. Chem. 349, 231-236 (1968)

HEVER, Ö. : Z. physiol. Chem. 325, 275-276 (1961)

HUGHES, D.E. und WILLIAMSON, D.H. : Biochem. J. 55, 851-856 (1954)

ISQUITH, A.J. und MOAT, A.G. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 565-571 (1966)

JOHNS, S.R. und MARION, L. : Can. J. Chem. 44, 23-27 (1966)

JOSHI, J.G. und HANDLER, P. : J. Biol. Chem. 237, 929-935 (1962)

KAKAC, B. und VEJDELEK, Z.J. : Handbuch der Kolorimetrie, Bd. II. Gustav Fischer Verlag, Jena (1963)

KARLIN, R. : Intern. Z. Vitaminforschg. 33, 311-320 (1963)

- - : Compt. Rend. Soc. Biol. 157, 850-853 (1963)

KATING, H. : Arch. Mikrobiol. 22, 235-247 (1955a)

Arch. Mikrobiol. 22, 368-395 (1955b)

Arch. Mikrobiol. 32, 207-218 (1959)

Pharmazeut. Ztg. 113, 810-818 (1968)

KATING, H. und DREPHAL, G. : Arch. Mikrobiol. 53, 163-172 (1966)

KIRCHNER, J., WATSON, J.G. und CHAYKIN, S. : J. Biol. Chem. 241, 953-960 (1966)

KNOBLOCH, H. : in: Chemie und Technik der Vitamine, Bd. 2 : Die wasserlöslichen Vitamine, 1. Lieferung. Ed. H. Vogel; F. Enke Verlag, Stuttgart (1955)

- - : in: Chemie und Technik der Vitamine, Bd.2 : Die wasserlöslichen Vitamine, 2. Lieferung, Ed. H. Vogel; F. Enke Verlag, Stuttgart (1957)

KNOX, W.E. und MEHLER, A.H. : J. Biol. Chem. 187, 419-424 (1950)

KÖNIG, W. : J. prakt. Chem. 69, 105 (1904a)

: J. prakt. Chem. 70, 19 (1904b)

KONNO, K., OIZUMI, K. und OKA, S. : Nature 205, 874-875 (1965)

KORNBERG, A. : J. Biol. Chem. 182, 805-813 (1950)

KORNBERG, A. und PRICER, W.E. : J. Biol. Chem. 186, 557-563 (1950)

KOTAKE, Y. und MASAYAMA, T. : Z. phys. Chem. 243, 237-241 (1936)

KUDRJAWZEW, W.I. : Die Systematik der Hefen. Akademie Verlag, Berlin (1960)

LAINE, T. und VIRTANEN, A.J. : in: Die Methoden der Fermentforschung, Bd. 3. Ed. E. Bamann und H. Myrbäck; Thieme Verlag, Leipzig (1941)

LANEN von, J.M. : Arch. Biochem. 12, 101-111 (1947)

LEETE, E. und FRIEDMAN, A.R. : J. Am. Chem. Soc. 86, 1224-1226 (1964)

LEWIS, J.C. : Arch. Biochem. 4, 217-228 (1944)

LEWIS, J.C., STUBBS, J.J. und NOBLE, W.M. : Arch. Biochem. 4, 389-401 (1944)

LINGENS, F. und VOLLPRECHT, P. : Z. physiol. Chem. 339, 64-74 (1964)

LISBOA, B.P. : Naturwissenschaften, 44, 617-619 (1957)

LONDON, J. : Biochim. Biophys. Acta 124, 241-245 (1966)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J. : J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

MÄRKI, F. und GREENGARD, P. : Biochim. Biophys. Acta 113, 587-594 (1966)

MAKAROVA, E.N. und OGANESYAN, S.P. : Isw. Akad. Nauk Arm. SSR, Biol. Nauki 16, 45-53 (1963)

Malkin, A. und DENSTEDT, O.F. : Canad. J. Biochem. Physiol. 34, 141-145 (1956)

MALTSEVA, N.N. : Mikrobiol. Zh., Akad. Nauk Ukr. RSR 23, 9-12 (1961)

MISRA, A.P. und MAHMOOD, M. : Indian Phytopathol. 14, 2o-22 (1961)

MÖLLER, E.F. : Chemiker Ztg. 85, 145-147 (1961)

MORRIS, E.O. : in: The chemistry and biology of yeast. Ed. A.H. Cook, Acad. Press, New York (1958)

MOTHES, E. : Z. allgem. Mikrobiol. 4, 42-58 (1964)

MOTHES, E., GROSS, D. SCHÜTTE, H.R. und MOTHES, K. : Naturwis= senschaften 48, 623 (1961)

MUKUNDAN, M.A., SUNDARAM, T.K. und SHANMUGASUNDARAM, E.R.B. : Current Sci. (India) 3o, 461-462 (1961)

MYSZKOWSKA, K., TAUTT, J., TUSZYNSKA, S. und WOZNIAK, W. : Chem. Anal. (Warsaw) 5, 471 (196o)

NIELSCH, W. : Chem. Ztg. 82, 137-138 (1958)

NIELSEN, N. und SCHNEIDER, G. : Acta Chem. Scand. 11, 685 (1957)

NISHIZUKA, Y. und HAYAISHI, O. : J. Biol. Chem. 238, PC 483-485 (1963)

NOVAK, E.K. und ZSOLT, J. : Acta Botanica (Hung.) 7, 93-145 (1961)

OKA, Y. : J. Biochem. 41, 89-99 (1954)

ORTEGA, M.V. und BROWN, G.M. : J. Biol. Chem. 235, 2939-2945 (196o)

PANTOS, G. : Agrokem. es Talajtan 1o, 511-522 (1961)

PARNAS, J.K. und WAGNER, R. : Biochem. Z. 125, 253 (1921)

PARTRIDGE, C.W.H., BONNER, D.M. und YANOFSKY, C. : J. Biol. Chem. 194, 269-278 (1952)

PETERSEN, K.F. : Z. Hyg. Infektionskrankh. 148, 539-545 (1962)

PERSHIN, G.N. und NESVADBA, V.V. : Biochimiya 25, 344-348 (196o)

PETRACK, B., GREENGARD, P., CRASTON, A. und KALINSKY, H. J. : Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 472-477 (1963)

PRATT, R. und JOHNSON, E. : J. Pharm. Sciences 53, 151-154 (1964)

PREISS, J. : Fed. Proc. 17, 291 (1958)

PREISS, J. und HANDLER, P. : J. Biol. Chem. 225, 759-77o (1957)

- - : J. Biol. Chem. 233, 488-5oo (1958)

PULLMAN, M.E., SAN PIETRO, A. und COLOWICK, S.P. : J. Biol. Chem. 2o6, 129-141 (1954)

RAAF, H. : Arch. Mikrobiol. 12, 131-182 (1941)

RAJAGOPALAN, K.V., SARMA, D.S.R., SUNDARAM, T.K. und SARMA, P.S. : Enzymologia 21, 277-282 (196o)

RAMSTAD, E. und AGURELL, S. : in: Ann. rev. of plant physiol. Ed. L. Machlis, 143-168 (1964)

RITSERT, K. : Klin. Wschr. 18, 934-936 (1939)

ROSE, A.H. : Nature 186, 139-14o (196o)

- - : J. Gen. Microbiol. 23, 143-152 (196o)

ROSE, A.H. and NICKERSON, W.J. : J. Bact. 72, 324-328 (1956)

SARMA, D.S.R., RAJALAKSHMI, S. und SARMA, P.S. : Enzymologia 24, 148-154 (1962)

- - : Biochim. Biophys. Acta 81, 311-322 (1964)

SATO, T. und MATSUSHITA, H. : Hakko Kyokaishi 19, 111-116 (1961) cit. CA 57, 156 17 h

SAXTON, R.E., ROCHA, V., ROSSER, R.J., ANDREOLI, A.J., SHIMOYA= MA, M., KOSAKA, A., CHANDLER, J.L.R. und GHOLSON, R.K. : Biochim. Biophys. Acta 156, 77-84 (1968)

SCOTT, T.A. und HUSSEY, H. : Biochem. J. 96, 9c-1oc (1965)

SMITH, D.T., RUFFIN, J.M. und SMITH, S.G. : J. Amer. Med. Assoc. 1o9, 2o54 (1937)

SPIES, T.D., COOPER, C. und BLANKENHORN, M.A. : J. Amer. Med. Assoc. 11o, 622 (1938)

STEINER, M. und KATING, H. : Biochem. Z. 332, 488-494 (196o)

STEINER, M., KATING, H. und JENDRALSKI, U. : Arch. Mikrobiol. 31, 244-254 (1958)

STEPANOVA, E.N. : Vopr. Pitaniya 22, 66-7o (1963)

STEVENS, C.O. und HENDERSON, L.M. : J. Biol. Chem. 234, 1187-119o (1959)

STROHECKER, R. : Vitaminanalyse. Chemische Methoden. E. Merck A.G., Darmstadt (1959)

SUOMALAINEN, H. : Pure Appl. Chem. 7, 639-654 (1963)

- - : J. Inst. Brewing 71, 221-226 (1965)

SUOMALAINEN, H., BJORKLUND, A., WIHERVAARA, K. und OURA, E. : J. Inst. Brewing 71, 221-226 (1965)

SUZUKI, Y. : Nippon Nogei-Kajaku Kaishi 35, 1241-1244 (1961)

SUNDARAM, T.K., RAJAGOPALAN, K.V., PICHAPPA, C.V. und SARMA, P.S. Biochem. J. 77, 145-149 (196o)

SWAMINATHAN, M. : Nature 141, 830-831 (1938)

TEERI, A.E. : Chemist-Analyst 41, 62 (1952)

ULRICH, J.A. und LARSEN, A.M. : J. Bacteriol. 56, 373-374 (1948)

WARBURG, O. und CHRISTIAN, W. : Biochem. Z. 274, 112 (1934)

- - : Biochem. Z. 275, 464 (1935)

WIHERVAARA, K. : J. Inst. Brewing 73, 167-171 (1967)

WILEY, A.J., DUBEY, G.A., LUECK, B.F. und HUGHES, L.P. : Industr. Engng. Chem. 42, 1830-1833 (1950)

WÖLTJE, W. : Zbl. Bakt., II. Abt. 48, 97-130 (1918)

WORK, T.S. und WORK, E. : The basis of chemotherapy. Oliver and Boyd, London (1948)

YAMANE, J., MIYAKAWA, K. und MATSUYA, Y. : Kosankinbyo Kenkyn Zasshi 14, 170-178 (1960); cit. CA 55, 156 13 h

YANG, K.S. und WALLER, G.R. : Phytochemistry 4, 881-889 (1965)

YANOFSKY, C. und BONNER, D.M. : J. Nutr. 44, 603-616 (1951)

ZINCKE, T. : Liebigs Ann. Chem. 330, 361 (1904)

ZINOVJEVA, K.G. und KLYUSHNIKOVA, T.M. : Mikrobiol. Zh., Akad. Nauk Ukr. RSR 24, 26-31 (1962); cit. CA 58, 11700b.

Lebenslauf

Ich wurde am 26. August 1938 in Groß-Methling (Meckl.) geboren. Von 1945 bis 1953 besuchte ich dort die Volksschule und anschließend die Goethe-Oberschule in Rostock, an der ich am 31. Mai 1957 die Reifeprüfung ablegte. Nach einjähriger Tätigkeit als Laborant in der Zentral-Apotheke der Universitäts-Kliniken in Rostock nahm ich von September 1958 bis März 1959 in Neustadt (Pfalz) an einem Ergänzungskursus für Abiturienten aus der SBZ teil und legte dort die Sonderprüfung ab. Von 1959 bis 1961 war ich Praktikant in der Einhorn-Apotheke in Barntrup (Lippe) und bestand am 9. März 1961 die pharmazeutische Vorprüfung in Detmold. Ab SS 1961 studierte ich Pharmazie an der Philipps-Universität in Marburg. Hier legte ich am 13. April 1964 die pharmazeutische Prüfung ab. Im Mai 1964 begann ich am Institut für Pharmakognosie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Kating die vorliegende Arbeit, die ich im November 1968 zum Abschluß brachte.